

Die Rolle von Lmx1b bei der Aufrechterhaltung der podozytären Struktur



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Jürgen Kastner

aus Nabburg

im Jahr 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 30. November 2011

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. R. Witzgall

Prüfungsausschuss: Vorsitzender:	Prof. Dr. A. Kurtz
1. Prüfer und Gutachter:	Prof. Dr. R. Witzgall
2. Prüfer und Gutachter:	Prof. Dr. R. Warth
3. Prüfer:	Prof. Dr. R. Rachel
Ersatzprüfer:	Prof. Dr. S. Schneuwly

Unterschrift:

**gewidmet meiner
herzallerliebsten Frau Irina**

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung.....	13
1.1 Der Strukturaufbau der Niere	13
1.2 Aufbau eines Nephrons	13
1.3 Die Filtrationsbarriere.....	14
1.3.1 Endothelzellen.....	15
1.3.2 Glomeruläre Basalmembran	16
1.3.3 Podozyten	18
A. Das podozytäre Grundgerüst und assoziierte Moleküle.....	18
B. Aufbau der Schlitzmembran	20
C. Aufrechterhaltung der Integrität der Podozyten: Zell-Matrix-Kontakte	23
D. Transkriptionelle Regulation der Podozyten	24
1.4 Der Transkriptionsfaktor LMX1B	26
1.4.1 Struktur und Aufbau von LMX1B	26
1.4.2 Funktion von LMX1B beim Menschen: Nagel-Patella-Syndrom	28
1.4.3 Funktion von <i>Lmx1b</i> bei der Maus: <i>Lmx1b</i> -Knockout Modelle.....	30
1.5 Zielsetzung	32
2. Material und Methoden	33
2.1 Materialien.....	33
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	33
2.1.2 Kits	36
2.1.3 Enzyme	37
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	37
2.1.5 Geräte und Instrumente	39
2.1.6 Genchip	41
2.1.7 Software	41
2.1.8 Internetdatenbanken	41
2.1.9 Antikörper	42
2.1.10 Oligonukleotide	43
A. Verwendung zur Genotypisierung	43
B. Verwendung für die Echtzeit-PCR	44
2.1.11 Säugerzelllinien	46
2.1.12 Mauslinien	46

2.1.13 Medien, Lösungen, Puffer	47
A. Isolierung genomischer DNA aus Gewebe und Genotypisierung	47
B. Kultur von Bakterien	48
C. Agarosegelelektrophorese	48
D. Zellkultur	49
E. Immunzytochemie/Immunhistochemie	50
F. Arbeiten mit Proteinen	51
G. Arbeiten mit Mäusen	54
2.2 Methoden	56
2.2.1 Arbeiten mit Bakterien	56
A. Lagerung und Kultivierung von Bakterien	56
B. Messung der optischen Dichte bei Bakterienkulturen	56
C. Plasmid-DNA-Maxipräparation aus <i>E. coli</i>	57
2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	57
2.2.3 Agarosegelelektrophorese	58
2.2.4 Arbeiten mit Säugerzelllinien	58
A. Kultivierung von Zellen	58
B. Ernte von Zellen	61
C. Induktion der Proteinsynthese	61
D. Herstellung von Ganzzelllysaten	62
E. Herstellung von Kern- und Cytoplasmalysaten	63
F. Präparation von globulären bzw. fibrillären Aktin	64
2.2.5 Scratch-Assay	64
2.2.6 Zell-Motilitäts-Test	65
2.2.7 Auszählung von angehefteten Zellen	65
2.2.8 Arbeiten mit Proteinen	66
A. Proteinbestimmung	66
B. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	66
C. Coomassie-Färbung	67
D. Western Blotting	67
E. Färbung mit Antikörpern	68
2.2.9 Arbeiten mit RNA	69
A. Gewinnung von RNA	69
B. Bestimmung der Konzentration von RNA	69

C. Kontrolle der Qualität der RNA	70
D. cDNA Synthese	70
E. Echtzeit-PCR	71
2.2.10 Immunzytochemie	74
2.2.11 Immunhistochemie	74
2.2.12 TUNEL-Färbungen	75
2.2.13 Mauszucht	76
2.2.14 Genotypisierung von Mäusen	77
A. Präparation genomischer DNA	77
B. Bestimmung des Genotyps mittels Polymerasekettenreaktion	77
C. Bestimmung des Genotyps mittels Southern Blot	79
2.2.15 Nierenentnahme und Perfusion von Mäusen	81
2.2.16 Präparation von Mäusenieren	82
A. Präparation für Lichtmikroskopie	82
B. Präparation für Elektronenmikroskopie	83
C. PEI-Färbungen für Elektronenmikroskopie	84
D. PAS-Färbung von Paraffinschnitten	85
E. HE-Färbung von Paraffinschnitten	86
F. RNA-Präparation	87
2.2.17 Induktion des <i>Lmx1b</i> -Knockouts bei Mäusen	87
2.2.18 Präparation von Glomeruli	87
2.2.19 Auswachsen von Zellen aus Glomeruli	90
2.2.20 Aufbereitung von Mäuse-Urin	90
2.2.21 Membranpotential-Messung	91
2.2.22 Anti-GBM-Serum	92
A. Herstellung	92
B. Anwendung	93
2.2.23 Gewinnung von Primärkulturen verschiedener Zelltypen	93
A. MEFs	93
B. ELISA von primären Milzzellen	95
C. Makrophagen	95
D. Dendritische Zellen	96
E. Präparation von Milz und Thymus	96
2.2.24 DNA-Mikroarray	97

3. Ergebnisse	98
3.1 Charakterisierung induzierbarer Podozyten-spezifischer <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäuse	98
3.1.1 Generierung von induzierbaren Podozyten-spezifischen <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäusen	98
3.1.2 Mäuse mit induzierbarem Podozyten-spezifischen <i>Lmx1b</i> -Knockout entwickeln eine Proteinurie	100
3.1.3 Der Verlust von Lmx1b in adulten Mäusen führt zu morphologischen Veränderungen der Nierenstruktur: HE-Färbungen	103
3.1.4 Elektronenmikroskopische Analysen zeigen einen Verlust der Nierenstruktur nach Inaktivierung von Lmx1b	104
3.1.5 Immunhistologische Färbungen zeigen keinen Verlust von funktionell bedeutsamen Proteinen bei Auftreten einer Proteinurie	107
3.1.6 Induzierbare <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäuse weisen keine Veränderung in der Ladungsdichte der glomerulären Basalmembran auf	108
3.1.7 Podozyten gehen aufgrund von Apoptose verloren	110
3.1.8 Analyse von apoptotischen Genen	111
3.2 Eigenschaften und Verhalten von <i>Lmx1b</i> /LMX1B-exprimierenden Zellen	115
3.2.1 Podozyten mit induziertem Podozyten-spezifischen <i>Lmx1b</i> -Knockout wachsen schneller aus Glomeruli aus	115
3.2.2 Zellen mit LMX1B-Expression schließen langsamer eine künstlich verursachte Lücke	116
3.2.3 Zellen mit LMX1B-Expression weisen eine geringere Zell-Motilität auf	121
3.2.4 LMX1B-exprimierende Zellen zeigen eine normale Färbung des Aktin-Zytoskeletts	122
3.2.5 Eine Beeinträchtigung von fibrillären oder globulären Aktin ist in LMX1B-exprimierenden Zellen nicht feststellbar	123
3.2.6 Podozyten von induzierbaren Podozyten-spezifischen <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäusen weisen kein verändertes Membranpotential auf	124
3.2.7 Zellen mit LMX1B-Expression haften sich schneller an ihre Oberfläche	125
3.2.8 LMX1B-exprimierende Zellen produzieren vermehrt das an der Adhäsion beteiligte Protein $\alpha 3$ -Integrin	127
3.2.9 Mikroarray-Analyse von für Adhäsion bzw. Zytoskelett verantwortlichen Genen	128
3.3 Untersuchung der Genexpression in konventionellen <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäusen zur Identifizierung von Zielgenen	132

3.3.1 Expressionsanalyse von <i>Lmx1b</i> in einzelnen Organen	132
3.3.2 Analyse des Mikroarray	133
3.4 Untersuchungen des Immunsystems an konventionellen <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäusen ...	140
3.4.1 Konventionelle heterozygote <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäuse zeigen eine verringerte Expression von Interferonen in Milz und Thymus	140
3.4.2 Dendritische Zellen exprimieren kein <i>Lmx1b</i>	142
3.4.3 Makrophagen exprimieren kein <i>Lmx1b</i>	144
3.4.4 Primäre Milzzellen von <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäusen weisen eine verringerte Akti- vierung von IL-6 produzierenden basophilen Granulozyten auf	144
3.4.5 MEFs	146
A. Test der Expression von Toll-like Rezeptoren in MEFs	146
B. Untersuchung des Effekts von LPS auf MEFs	147
C. Untersuchung des Effekts von Interferon- γ auf MEFs	149
D. Untersuchung des Effekts von Peptidoglykan auf MEFs	151
E. Untersuchung des Effekts von Poly I:C auf MEFs	152
3.4.6 Mikroarray-Analyse von Genen mit Relevanz für die Immunregulation	154
3.4.7 Mäuse mit heterozygotem <i>Lmx1b</i> -Verlust zeigen eine stärkere Reaktion auf ein gegen die glomeruläre Basalmembran gerichtetes Serum als Wildtyp Mäuse	157
4. Diskussion.....	159
4.1 Einführung	159
4.2 Charakterisierung induzierbarer Podozyten-spezifischer <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäuse	160
4.2.1 Induzierte Podozyten-spezifische <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäuse entwickeln eine hef- tige Proteinurie.....	160
4.2.2 Keine gravierenden renalen Schäden nach Bildung einer frühen Proteinurie er- kennbar, allerdings nach längerer Beobachtung	161
4.2.3 Podozyten gehen aufgrund von Apoptose verloren	162
4.3 Aufklärung des Einflusses von <i>Lmx1b</i> an der Aufrechterhaltung der podozytären Struktur	164
4.3.1 Zellen ohne LMX1B zeigen eine höhere Motilität als mit LMX1B.....	164
4.3.2 Keine Veränderungen der Organisation des Aktin-Zytoskeletts ohne LMX1B feststellbar	165
4.3.3 Keine Beeinträchtigung der Ladungskomposition der GBM erkennbar	167
4.3.4 <i>Lmx1b</i> /LMX1B ist an der Vermittlung des Kontakts von Zellen zu ihrer Ober-	

fläche beteiligt	167
4.4 Immunologische Relevanz von <i>Lmx1b</i>	169
4.4.1 <i>Lmx1b</i> ist an der Regulation der Immunantwort beteiligt	169
4.4.2 Durch Stimulation von MEFs über Toll-like Rezeptoren wird die Expression von <i>Lmx1b</i> herabgesetzt	172
5. Zusammenfassung	174
6. Literaturverzeichnis	176
7. Veröffentlichungen	201
8. Lebenslauf	202
9. Danksagung	203

Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elementsymbole wurden gemäß der IUPAC-Richtlinien verwendet.

A	Ampere
A ₄₅₀	Absorption bei 450nm
A ₅₉₀	Absorption bei 590nm
Abb.	Abbildung
ACTN4	α -Aktinin-4
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bidest	zweimal destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
cM	Centi-Morgan
CNS	Kongenitales Nephrotisches Syndrom
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
<i>COL4a3</i>	α 3-Kette von Kollagen IV
<i>COL4a4</i>	α 4-Kette von Kollagen IV
Cre	Cyclization recombination
C-terminus	Karboxyterminus
CTP	Cytidintriphosphat
CT-Wert	Schwellenwert bei Echtzeit-PCR

Cy3	Carbocyanin 3
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
d(GAT)TP	Mischung aus dGTP, dATP und dTTP
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP's	Desoxynukleosidtriphosphate
Dox	Doxyzyklin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Embryonaltag
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgebundener Immunabsorptionstest („enzyme-linked immunosorbent assay“)
EM	Elektronenmikroskop
et al.	et alii
evtl.	eventuell
FCS	Fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FOXC2	Forkhead box c2 – Transkriptionsfaktor
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GA	Glutaraldehyd
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFP	grün fluoreszierendes Protein

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HD	Homeodomäne
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie
H&E	Hämatoxylin & Eosin
His	Histidin
HOOD	Hereditäre Osteo-Onycho-Dysplasie
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“)
HtTA	HeLa-Zelllinie, die konstitutiv den Tetrazyklin-Transaktivator exprimiert
Ig	Immunglobulin
ILK	Integrin-linked Kinase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
KAc	Kaliumazetat
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
ko	knock-out
l	Liter
LamA/C	Lamin A/C
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LDB	Lim-Domäne bindendes Protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LMX1B	LIM Homeobox Transkriptionsfaktor 1 Beta
loxP	Locus of x-cover of P1
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	molar
mA	Milliampere
max.	maximal
MCS	vielfache Klonierungsstelle („multiple cloning site“)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	Boten-RNA („messenger ribonucleic acid“)
µg	Mikrogramm ($=10^{-6}\text{g}$)
µl	Mikroliter ($=10^{-6}\text{l}$)
µM	mikromolar
n	Anzahl
NaAc	Natriumazetat
NF-κB	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P40
NPHS1	Nephrin
NPHS2	Podozin
NPS	Nagel-Patella-Syndrom
NS	Nephrotisches Syndrom
N-Terminus	Aminotерminus
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
ORF	kodierende Sequenz eines Gens („open reading frame“)
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Perjodschiffsäure
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate-buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-qPCR
rtTA	reverser Tetrazyklin-Transaktivator
s	Sekunde
S9	ribosomales Protein der 30S-Untereinheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sog.	sogenannt
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
t	Zeit
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE	Tris/EDTA-Puffer
Tet	Tetrazyklin
tetO	Tetrazyklin-Operator
tetR	Tetrazyklin-Repressor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tTA	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
U	Einheit ("unit")
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
usw.	und so weiter
UTP	Uridintriphosphat
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
v:v	Verhältnis Volumen zu Volumen
Wt	Wildtyp
WT1	Wilms Tumor 1
z.B.	zum Beispiel

ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula occludens 1
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Der Strukturaufbau der Niere

Die Abgabe von Abfall- und Abbauprodukten ist ein lebenswichtiger Prozess, den der menschliche Körper fortwährend vollziehen muss. Hierbei ist die Niere ein besonders wichtiges Organ, um sich von Giften und nicht mehr benötigten Stoffen zu entledigen. Doch der Mechanismus der Reinigung bedarf einer genauen Regulation und strenger Kontrolle, sieht man doch die Folgen erst, wenn es zu Störungen in diesem System kommt. Während der histologische Aufbau der Niere weitestgehend aufgeklärt ist, sind viele molekulare und physiologische Vorgänge noch unverstanden und Bestandteil gegenwärtiger Forschung.

Der Mensch besitzt zwei bohnenförmige Nieren, die retroperitoneal beiderseits der Wirbelsäule liegen und vorwiegend der Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten über den Harn dienen. Aber auch die Überwachung des Wasser- und Salzhaushaltes oder des Säure-Base-Gleichgewichtes sowie die Kontrolle von Hormonen oder des Blutdrucks sind wichtige Aufgaben, die die Niere übernimmt, weshalb sie auch von vielen Blutgefäßen durchzogen wird. Aus diesem Blut filtern die Nieren eine große Menge an Flüssigkeit und nahezu alle darin gelösten niedermolekularen Stoffe, wobei sich dadurch pro Tag 180-200l Primärharn bildet. Dieser Primärharn wird wiederum durch ein sich anschließendes Tubulussystem geleitet, welches ca. 99% der für den Körper notwendigen Flüssigkeit rückresorbiert und dem Organismus wieder zuführt, so dass letzten Endes nur ein Endharn von etwa 2-3l ausgeschieden wird. Diese ungeheure Filtrationsleistung führen spezielle Baueinheiten, sog. Nephrone durch, von denen ca. 1-1,4 Millionen pro Niere vorkommen.

1.2 Aufbau eines Nephrons

Ein Nephron setzt sich aus einem Nierenkörperchen, auch Malpighi-Körperchen genannt, und einem Nierentubulus zusammen. Während das Nierenkörperchen in der Rinde der Niere lokalisiert ist, kommt das Tubulussystem sowohl in der Rinde als auch im Markbereich vor. Jedes Nierenkörperchen wiederum besteht aus einem Kapillarknäuel, einer Bowman-Kapsel und dem Mesangium. Die Mesangiumzellen bilden das Rückgrat des Glomerulum und befestigen die Kapillarschlingen. Die Gefäße selbst stülpen sich in die zunächst ballonartige Struktur eines epi-

thelial-begrenzten Lumens ein, so dass eine doppelwandige Kapsel (=Bowman-Kapsel) mit einem äußeren (=parietalen) und einem inneren (=viszeralem) Blatt entsteht. Das äußere Blatt kleidet nun den gesamten Kapselraum mit einem Plattenepithel aus, während das innere Blatt, dessen Epithelzellen sich zu spezialisierten Zellen, den Podozyten, differenzieren, den Kapillaren aufliegt. Zwischen dem äußeren und inneren Blatt hat sich nun ein Lumen gebildet, in dem der filtrierte Anteil des Blutplasmas (=Primärharn) aufgenommen wird; von hier aus wird der Primärharn über das Tubulussystem weitergeleitet. Die Endothelzellen der Kapillaren, die glomeruläre Basalmembran (bestehend aus den beiden Basallaminae der Endothelzellen und der Podozyten) und die Podozyten bilden gemeinsam die Filtrationsbarriere, die das Blutplasma durchlaufen muss. Eine Störung dieser Filtration kann zu einem Verlust von wichtigen hochmolekularen Molekülen führen.

1.3 Die Filtrationsbarriere

Die Filtrationsbarriere der Niere ist ein komplexes Gebilde, welches wie ein molekulares Sieb funktionieren soll: Zum einen soll sie Wasser und kleine gelöste Stoffe ungehindert durchlaufen lassen, zum anderen soll sie Plasmaproteine und noch benötigte Stoffe zurückhalten. Um dies bewerkstelligen zu können, setzt sie sich aus drei Schichten zusammen, die jede für sich Plasmaproteine zurückhalten kann, aber in ihrer Gesamtheit ein erstaunliches und effektives System der Filtration darstellen. Diese Barriere setzt sich aus einer inneren Endothelzellschicht, folgend von der glomerulären Basalmembran und abschließend von der Podozytenzellschicht mit einer interdigitierenden Schlitzmembran zusammen. Da eine Störung einer dieser Schichten zu einer Proteinurie führen kann, kann man schlussfolgern, dass alle drei wesentlich zur Bildung der Filtrationsbarriere beitragen und im Einzelnen näher betrachtet werden müssen (s.a. Abb. 1) [Jarad & Miner, 2009].

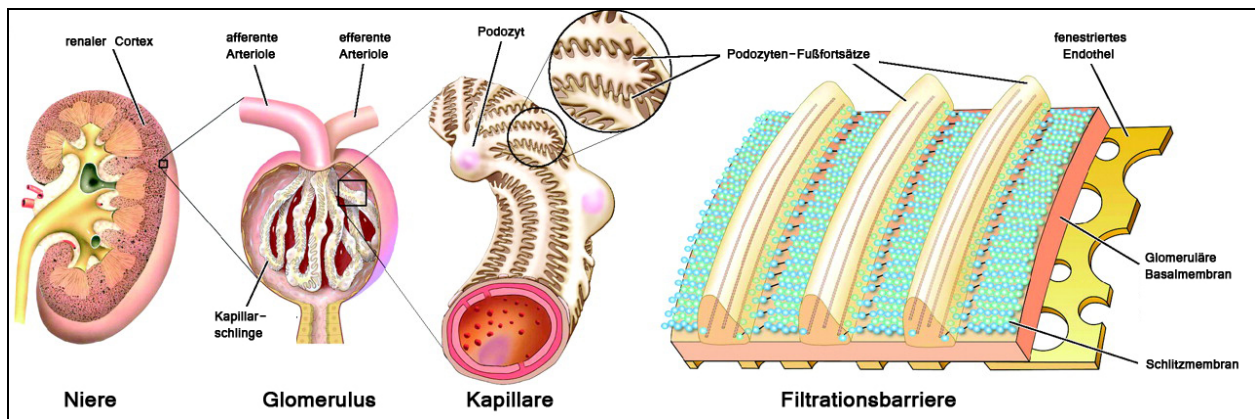


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Nephrons. Im Bereich des renalen Cortex befinden sich zahlreiche Glomeruli, durch die mehrere Kapillarschlingen ziehen. Diese Kapillaren sind von Podozyten umgeben, welche zusammen mit der glomerulären Basalmembran und der Kapillar-Endothelschicht die Filtrationsbarriere der Niere bilden [abgeändert aus Tryggvason & Wartiovaara, 2005].

1.3.1 Endothelzellen

Das Endothel der glomerulären Kapillaren unterscheidet sich in nur einigen wenigen Punkten von dem eines „gewöhnlichen“ Endothels: zum einen sind die glomerulären Endothelzellen flacher als normale Endothelzellen und zum anderen bilden sie auch große Poren, sog. Fenestrae, ohne Diaphragma zwischen den einzelnen Endothelzellen [Ballermann, 2005]. Diese Poren machen die Endothelschicht zu einer der durchlässigsten Endothelschichten überhaupt, weshalb sie lange nicht als relevante Barriere für die Filtration angesehen wurde. Allerdings konnte in neueren Studien sowohl ein akutes [Sutton et al., 2002; Brodsky et al., 2002] als auch ein chronisches Nierenversagen [Cottone et al., 2002; Jacobson et al., 2002] nach einer Störung der glomerulären Endothelschicht beobachtet werden. Wie in einem Maus-Modell gezeigt werden konnte, nimmt man an, dass auch Nephropathien bei Patienten mit Diabetes auf eine Dysfunktion der Endothelzellen zurückgeführt werden können [Nakagawa et al., 2007]. Ebenso kann bei der sog. Präeklampsie (einer hypertensiven Erkrankung in der Schwangerschaft) eine Störung dieser Fenestrierung und Abflachung der Zellen beobachtet werden, was in einer Proteinurie und einer erniedrigten glomerulären Filtrationsrate resultiert [Ballermann, 2007]. Wie hierzu in Knockout Mausstudien gezeigt werden konnte, trägt das Signalmolekül VEGF-A, welches von Podozyten sezerniert wird, erheblich dazu bei, die Formierung und Aufrechterhaltung der Endothel-Fenestrierung zu bewerkstelligen. Wurde bei Mäusen die Expression von VEGF-A ausgeschaltet oder wurden gegen VEGF-A gerichtete Antikörper injiziert, konnte ein Verlust der Fenestrierung, einhergehend mit einer Proteinurie, beobachtet werden [Ballermann, 2005; Eremina et al.,

2003; Sugimoto et al., 2003]. Ähnliche Ergebnisse konnten für einen Verlust des Signalmoleküls TGF- β 1 nachgewiesen werden, was ebenfalls zu einer Störung der Fenestrierung führte [Liu et al., 1999].

Ferner ist das glomeruläre Endothel von einer negativ geladenen Glykokalix bedeckt, welche die Endothelzellen umgibt und eine mehr oder weniger „gelartige Schicht“ darstellen soll [Deen, 2004; Ohlson et al., 2001]. Diese Schicht besteht vorwiegend aus Glykoproteinen, Sialoproteinen, Glykolipiden und weiteren Plasmaproteinen, was die negative Ladung der Glykokalix bewirkt. Aufgrund dieser negativen Ladung wirkt die Endothelschicht bereits als Hürde für andere anionische Makromoleküle [Jeansson & Haraldsson, 2006; Henry et al., 1999] und weist der Glykokalix eine große Bedeutung als Filtrationsbarriere aus. Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Endothelzellschicht als nicht irrelevant bei der Filtration des Blutplasmas angesehen.

1.3.2 Glomeruläre Basalmembran

Die glomeruläre Basalmembran (GBM) ist die mittlere Schicht zwischen dem Endothel und den Podozyten und setzt sich aus den beiden Basallaminae der Kapillaren und der Podozyten zusammen [Jarad et al., 2006]. Dadurch erhält die GBM eine Dreischichtung aus Lamina rara interna, Lamina densa und Lamina rara externa. Ferner sind die Proteine der Basalmembran stark negativ geladen, wodurch Blutproteine, die selber anionisch sind, am Durchtritt gehindert werden. Zu diesen Basalmembran-Proteinen gehören vorwiegend Laminin, Nidogen und Typ IV Kollagen, die zusammen mit Proteoglykanen, Heparansulfat und Chondroitinsulfat ein dynamisches Netzwerk bilden, das so dicht ist, dass kleinere Proteine und Polypeptide ungehindert durchtreten können, während Albumin oder noch größere Proteine zurückgehalten werden [Tryggvason & Wartiovaara, 2001].

Das Grundgerüst der glomerulären Basalmembran bildet Kollagen Typ IV, welches Ansatzpunkt für weitere Moleküle ist [Timpl & Brown, 1996]. Je nach Entwicklungsstufe besitzt das Kollagen IV eine unterschiedlich dreifach-helikale Zusammensetzung: während die embryonale Basalmembran eine α 1/ α 1/ α 2-Kette enthält, ändert sich die Zusammensetzung des Kollagens zu einer α 3/ α 4/ α 5-Kette in der vollständig entwickelten Basalmembran [Hudson et al., 1993; Miner & Sanes, 1994]. Diese Isoform von Kollagen Typ IV besitzt mehr Cysteine und ist folglich weniger anfällig für Degradation als die embryonale Form [Tryggvason & Patrakka, 2006]. Fehl-

bildungen dieser Kollagen α -Ketten können zum sog. Alport-Syndrom führen, einem Syndrom, das vorwiegend (~80%) Männer betrifft [Gunwar et al., 1998]. Hier verhindern Mutationen in einer der α -Ketten des Kollagens ($\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$) die Bildung eines intakten Kollagen-Netzwerkes. Es kommt nicht zum Wechsel von der embryonalen zur erwachsenen Kollagen-Form, wodurch weiterhin ein Aufbau aus $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ -Ketten bestehen bleibt, um den Verlust zu kompensieren [Hudson et al., 2003; Miner & Sanes, 1994]. Patienten mit Alport-Syndrom weisen daraufhin eine lokale Verdickung der GBM oder eine gesplittete Lamina densa auf und zeigen einen Krankheitsverlauf beginnend von einer Hämaturie bzw. Proteinurie bis hin zum chronischen Nierenversagen. Ferner können Mutationen in *COL4A3* oder *COL4A4*, die jeweils für die $\alpha 3$ - bzw. $\alpha 4$ -Ketten kodieren, zu einer Nephropathie mit einer dünnen Basalmembran führen, was wiederum zu Hämaturie oder chronischem Nierenversagen führen kann [Tryggvason & Patrakka, 2006; Haas, 2009].

Ein weiterer Hauptbestandteil der glomerulären Basalmembran ist Laminin, das über Nidogen mit dem Kollagen-Netzwerk verbunden ist, welches aber auch über Integrine mit angrenzenden Zellen verbunden ist. Laminine sind heterotrimere Glykoproteine, die aus α -, β - und γ -Ketten bestehen [Jarad et al., 2006]. Bis heute wurden in Säugetieren 16 verschiedene Heterotrimere gefunden, dabei kommt speziell in der voll differenzierten glomerulären Basalmembran nur das Laminin- $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ (=LM-521) [Miner, 1999; Jakobsson et al., 2008] vor, während kindliches, unreifes Laminin aus $\beta 1$ -Ketten (LM-511) besteht [Noakes et al., 1995]. Ein Defekt dieser $\beta 2$ -Ketten führt zu einer Beibehaltung der $\beta 1$ -Ketten, um den Verlust zu kompensieren, was aber in Nierendefekten resultiert [Zenker et al., 2004]. Knockout-Mausstudien (*Lamb2*^{-/-}) haben gezeigt, dass ein Verlust der $\beta 2$ -Kette zu neuromuskulären Defekten und einer schweren Proteinurie führt, wobei auch ein zunehmender Verlust der Fußfortsätze der Podozyten beobachtet werden kann [Miner et al., 2006; Jarad et al., 2006]. Bei Patienten mit Pierson-Syndrom konnten Mutationen im für die $\beta 2$ -Kette kodierenden Gen *LAMB2* nachgewiesen werden, die Augenveränderungen, psychomotorische Defekte und ein kongenitales nephrotisches Syndrom entwickeln [Choi et al., 2008; Zenker et al., 2004].

Man nimmt an, dass Heparansulfat-Proteoglykane, wie z.B. Perlecan oder Agrin, verantwortlich sind für die Bildung der anionischen Ladung in der GBM [Groffen et al., 1998; Caulfield & Farquhar, 1978]. Untersuchte man bei verschiedenen Nierenerkrankungen, die mit Proteinurie einhergehen, die Mengen der anionischen Heparansulfat-Seitenketten, stellte man fest, dass diese z.B. bei der diabetischen Nephropathie, beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) oder

der Minimal-Change Glomerulonephritis erniedrigt waren. Somit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Verlust der anionischen Seiten und der Entwicklung einer Proteinurie hergestellt werden [Raats et al., 2000]. Allerdings zeigen neueste Daten von Nieren-spezifischen Agrin Knockout Mäusen, dass diese zwar eine deutliche Reduzierung der anionischen Ladung entlang der subepithelialen Schicht aufweisen, die Mäuse allerdings keine Proteinurie entwickeln und keine weiteren Veränderungen in ihrer Nierenstruktur aufweisen [Harvey et al., 2007]. Auch die in-vivo Behandlung von Ratten mit Heparanase, einem Enzym, um Heparansulfat zu degradieren, führte zu einem Verlust der Ladungspunkte entlang der GBM – allerdings nicht zu einer Proteinurie [Wijnhoven et al., 2007]. Der Einfluss der Ladung wird somit nach wie vor kontrovers diskutiert.

1.3.3 Podozyten

Die äußerste, d.h. die Kapillaren und GBM umgebende Schicht, sind die Podozyten. Da sie auch an der Ausbildung der sog. Schlitzmembran, die zwischen diesen Fußfortsätzen liegt, beteiligt sind, sind sie von herausragender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion. Dieser molekulare „Filter“ soll Proteine von der Größe von Albumin oder größer davon abhalten, in den Kapselraum abgegeben zu werden. Aufgrund anhaltender und intensiver Erforschung der Podozyten konnte bis heute bereits eine Vielzahl an vererbten und erworbenen Nierenerkrankungen aufgedeckt werden, was auf die zentrale Relevanz dieses Zelltyps hinweist. Ebenso sind die Podozyten für die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen der GBM verantwortlich und so maßgeblich an der Strukturhaltung der Glomeruli beteiligt.

A. Das podozytäre Grundgerüst und assoziierte Moleküle

Podozyten setzen sich aus einem Zellkörper und daran anschließenden Primär- und Sekundärfußfortsätzen zusammen. Vom Zellkörper laufen zahlreiche Fortsätze zu den Kapillaren und umschlingen diese wie die Finger einer Hand. Sind die Fußfortsätze nahe am Körper noch dick und mächtig (primäre Fußfortsätze), werden sie zu den Kapillaren hin immer dünner und bilden sekundäre Fortsätze aus. Um die Form der Podozyten zu halten, ist der strukturelle Aufbau von besonderer Bedeutung, führen doch Veränderungen zu einer Proteinurie.

Mikrotubuli und Intermediärfilamente wie Desmin und Vimentin bilden das Grundgerüst eines Podozyten-Körpers, wobei in den sekundären Fußfortsätzen vorwiegend Mikrofilamente, Myosin-2, α -Actinin-4, Talin, Vinculin, Paxillin und Synaptopodin vorkommen, die die dynamische und kontraktile Struktur aufrecht erhalten (s.a. Abb. 2) [Kobayashi et al., 1998; Asanuma et al., 2005]. Kommt es zu einer Reorganisation des Aktin-Netzwerks, verliert das Aktin-Gerüst seine Flexibilität und der Podozyt löst sich von der darunter liegenden GBM, was wiederum zu einem Verlust der Filtrationsfähigkeit führt.

Ein Protein, welches das komplexe Geflecht aus Aktin-Strängen bündelt und miteinander vernetzt, ist α -Actinin-4 [Otey & Carpen, 2004]. Mutationen im für α -Actinin-4 kodierenden Gen *ACTN4* führen zu einer Form der autosomal dominanten fokalen und segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), wobei Patienten eine fortschreitende Niereninsuffizienz mit Proteinurie erleiden. Molekulare Untersuchungen von Patientennieren deckten auf, dass mutiertes α -Actinin-4 eine erhöhte Affinität zu F-Aktin aufwies und somit eine Versteifung des Aktin-Zytoskeletts zu beobachten war [Kaplan et al., 2000; Yao et al., 2004]. Während heterozygote *Actn4*-Knockout Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp aufwiesen, zeigten homozygote Knockout Mäuse eine progressive Proteinurie, schwere glomeruläre Schäden und eine Lebenserwartung von nur wenigen Monaten. Bei ultrastrukturellen Aufnahmen konnte sowohl ein Verlust der Fußfortsätze der Podozyten als auch Proteinablagerungen innerhalb des Filtrationsapparates gezeigt werden [Michaud et al., 2003; Kos et al., 2003].

Ein weiteres Protein, das innerhalb der Podozyten mit Aktin interagiert, ist Synaptopodin, wobei *Synaptopodin*-Knockout Mäuse einen normalen Nierenphänotyp zeigen. Induziert man aber einen Verlust von Podozytenfortsätzen durch den Einsatz von Protaminsulfat oder LPS, zeigen *Synpo*^(-/-)-Mäuse eine schlechtere Reorganisation des Aktin-Netzwerkes als ihre gesunden Vergleichstiere [Srivastava et al., 2001; Asanuma et al., 2005]. Ferner sollte erwähnt werden, dass Synaptopodin mit α -Actinin-4 interagiert und dadurch eine Bündelung und Verlängerung von Aktinfilamenten vorangetrieben wird [Asanuma et al., 2005].

Ebenso ist die luminal Seite der Podozyten von einer dicken Glykokalix überzogen, die in hoher Konzentration Sialoglykoproteine, insbesondere Podocalyxin und Podoendin, enthält, welche für die anionische Oberflächenladung der Podozyten verantwortlich ist [Kerjaschki et al., 1984]. Ein Wegfall dieser Ladung kann ebenso zu der Ausbildung einer Proteinurie führen.

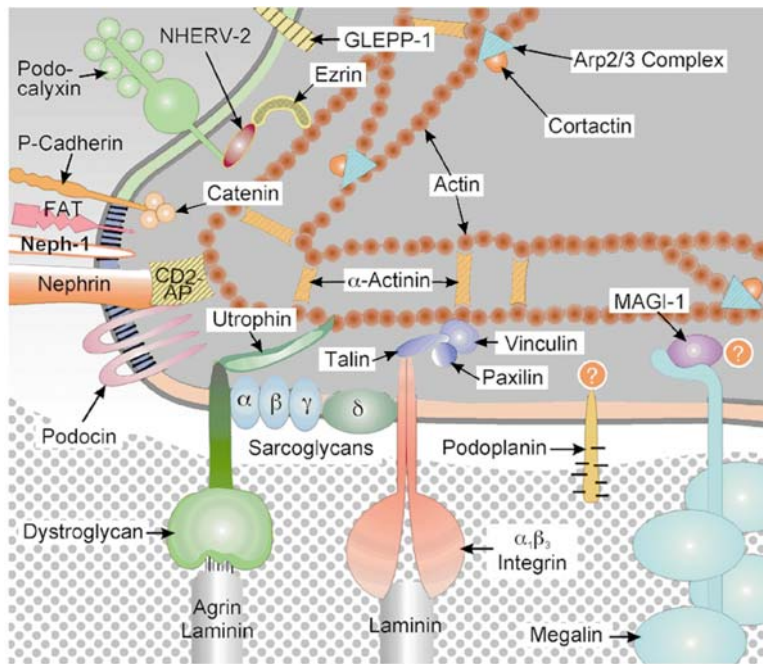


Abb. 2: Molekularer Aufbau eines Podozyten und seiner Verankerung.

Das Grundgerüst der Fortsätze von Podozyten bilden Aktin und α -Actinin, welches vorwiegend über Catenin und CD2AP mit Proteinen der Schlitzmembran (u.a. Nephlin, Podocin) verbunden ist. Über Dystroglykane und Integrine sind Podozyten mit der glomerulären Basalmembran verankert [aus Kerjaschki, 2001].

B. Aufbau der Schlitzmembran

Betrachtet man den räumlichen Aufbau der Podozyten von der Bowman-Kapsel aus, kann man deutlich die ~40 nm breiten Filtrationsschlitze erkennen, die durch eine elektronendichte Membran, die sog. Schlitzmembran, überbrückt werden und ein Reißverschluss-ähnliches Aussehen besitzen [Rodewald & Karnovsky, 1974; Furukawa et al., 1991; Wartiovaara et al., 2004]. Ein Hauptbestandteil der Schlitzmembran ist Nephlin wobei dessen zytoplasmatischer Teil an intrazelluläre Adapterproteine wie CD2AP, Nck2 und Densin bindet, die wiederum mit dem Aktinzytoskelett assoziiert sind und dadurch einen wichtigen Part in der Regulation des Podozyten-Aufbaus spielen [Ruotsalainen et al., 1999]. So konnte Kestilä 1998 zeigen, dass Patienten mit einer Mutation im für Nephlin kodieren Gen *NPHS1* ein kongenitales nephrotisches Syndrom vom finnischen Typ entwickeln, welches schon im Uterus zu einer starken Proteinurie und schließlich zu einem frühen Tod führt. Ebenso können einige weitere Mutationen in *NPHS1* auch zu einer milden FSGS führen [Tryggvason & Wartiovaara, 2005]. Schon allein eine Reduktion des Expressionslevels von Nephlin resultiert in diversen nephrotischen Syndromen, was auf eine starke Relevanz dieses Schlitzmembranproteins zur Aufrechterhaltung der glomerulären Funktion hindeutet [Chuang & He, 2009]. *Nphs1*-Knockout Mäuse zeigten eine ausgeprägte Proteinurie mit einem Verlust von Podozytenfortsätzen und einer fehlenden Schlitzmembran. Aufgrund dieser starken Beeinträchtigungen sterben diese Mäuse innerhalb der ersten 24 h nach der Geburt [Putaala et al., 2001].

Der Ausfall von Podocin, einem weiteren wichtigen Protein der Schlitzmembran, führt zu einem autosomal-rezessiven, Steroid-resistenten nephrotischen Syndrom mit einer rasch fortschreitenden Niereninsuffizienz und einer fokalen segmentalen Glomerulosklerose [Boute et al., 2000]. Huber et al. konnte 2001 zeigen, dass Podocin mit Nephrin interagiert und dadurch sowohl eine Stabilisierung als auch die Rekrutierung von Nephrin erreicht wird. Somit leistet Podocin einen großen Beitrag zur Nephrin-abhängigen Signalübertragung. Ein Jahr später konnte auch eine Interaktion mit CD2AP nachgewiesen werden, was wiederum Podocin eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von Schlitzmembran-Proteinen, wie z.B. auch NEPH1, und der intrazellulären Signalweiterleitung beimeisst [Sellin et al., 2003; Schwarz et al., 2001]. Übereinstimmend zu den Beobachtungen bei Patienten zeigten *Nphs2*-Knockout Mäuse eine schwere Proteinurie bei der Geburt und entwickelten eine massive mesangiale Sklerose, was innerhalb einiger weniger Tage zum Tod der Mäuse führte. Man konnte einen Verlust der Schlitzmembran und Fußfortsätze sowie eine veränderte Synthese von weiteren Schlitzmembran-Proteinen feststellen [Roselli et al., 2004]; erstaunlicherweise konnte aber keine Bildung einer FSGS bei Mäusen beobachtet werden.

CD2AP stellt ein Adaptorprotein dar, das verschiedene Proteine wie Nephrin, Podocin oder auch Synaptopodin mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet [Lehtonen et al., 2002; Schwarz et al., 2001; Shih et al., 2001]. Somit besitzt es eine Schlüsselrolle in der Regulation des Podozyten-Zytoskeletts durch Schlitzmembran-Proteine. Die Herstellung einer *Cd2ap*-Knockout Maus zeigte, dass ein Ausfall von *Cd2ap* zum Tod der Mäuse nach 6 bis 7 Wochen mit einer schweren Proteinurie führt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten hierbei einen großflächigen Verlust von Fußfortsätzen [Shih et al., 1999]. Untersuchte man heterozygote *Cd2ap*^(+/-)-Knockout Mäuse, zeigten diese zunächst keine Proteinurie, wobei in einem Zeitraum von 9 Monaten glomeruläre Schäden auftraten und ein Krankheitsbild ähnlich von FSGS-Patienten festzustellen war. Untersuchte man daraufhin Patienten mit FSGS, konnte in einigen Fällen eine Mutation in CD2AP festgestellt werden, was auf eine zentrale Rolle von CD2AP bei der Bildung einer intakten Filtrationsbarriere schließen lässt [Kim et al., 2003; Löwik et al., 2007].

Der Aufbau der Proteine NEPH1 und NEPH2 ist dem von Nephrin sehr ähnlich und lässt auf eine nahe Verwandtschaft dieser Proteine schließen. Als Transmembranproteine der Schlitzmembran können NEPH1 oder NEPH2 sowohl an Nephrin als auch an Podocin und ZO-1 binden [Barletta et al., 2003; Liu et al., 2003; Gerke et al., 2005]. Während NEPH2 noch kaum untersucht wurde, konnte bei *Neph*-Knockout Mäusen eine ausgeprägte Proteinurie mit verbreiterten Fußfortsätzen und ein kongenitales nephrotisches Syndrom nachgewiesen werden; ähnlich wie bei

Nphs1-Knockout Mäusen [Donoviel et al., 2001]. Allerdings sind bis jetzt noch keine Krankheitsbilder beim Menschen nach einem Ausfall von NEPH1 beschrieben.

ZO-1 (Zonula occludens-1) war das erste Protein, das an der intrazellulären Seite der Schlitzmembran lokalisiert wurde [Schnabel et al., 1990]. Obwohl bisher noch nicht viel über die Rolle dieses Linker-Proteins in Podozyten bekannt ist, weiß man zumindest doch, dass es an NEPH-Proteine bindet und diese mit dem Zytoskelett der Fußfortsätze verbindet [Huber et al., 2003]. Man nimmt deshalb an, dass ZO-1 ein Grundgerüst für die Organisation der NEPH1-Proteine darstellt.

Das Protocadherin FAT1 stellt ein wichtiges Transmembranprotein der Schlitzmembran dar, das als essentiell für die Aktin-Polymerisation identifiziert wurde [Inoue et al., 2001; Tryggvason et al., 2006]. Betrachtet man *Fat1*-Knockout Mäuse, kann man das Fehlen der Schlitzmembran und eine Fusion der Podozyten-Fußfortsätze beobachten, was letzten Endes zu einer schweren Proteinurie mit Nierenversagen führt und den Tod der Mäuse verursacht [Ciani et al., 2003]. Ferner konnte gezeigt werden, dass FAT1 direkt mit Ena/VASP-Proteinen interagiert, welche für eine Regulation des Aktin-Komplexes verantwortlich sind [Moeller et al., 2004; Tanoue & Takeichi, 2004].

Ein klassisches Cadherin der Schlitzmembran ist P-Cadherin, welches intrazellulär mit β -Catenin interagiert und somit die Schlitzmembran mit dem Zytoskelett verlinkt [Reiser et al., 2000]. Gendeletion von *P-Cadherin* in Mäusen führt zu keinem nennenswerten Ausfall der Filtrationsfunktion und P-Cadherin scheint deshalb nicht notwendig für die Entwicklung oder Funktion der Niere zu sein [Radice et al., 1997; Tryggvason & Wartiovaara, 2005]. Interessanterweise resultiert eine Blockierung von P-Cadherin durch Injektion von spezifischen Antikörpern in Ratten zu einem signifikanten Anstieg der Proteinurie [Liu et al., 2003]. Ebenfalls konnte Xu et al. 2005 eine verminderte Expression von P-Cadherin in Podozyten von Ratten mit einer diabetischen Nephropathie nachweisen, was wiederum die Rolle von P-Cadherin bei der Ausbildung einer Proteinurie widerspiegelt.

C. Aufrechterhaltung der Integrität der Podozyten: Zell-Matrix-Kontakte

Während die Zellkörper der Podozyten sich im Harnraum der Bowman-Kapsel befinden, sind ihre Fußfortsätze über $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin und Dystroglykan mit der glomerulären Basalmembran verbunden [Kerjaschki, 2001]. Diese Verbindung ist essentiell für eine ordnungsgemäße Filtration, führt doch ein Verlust dieser Verbindung immer zu einem nephrotischen Syndrom.

Während die $\alpha 3 \beta 1$ -Integrine mit dem Zytoskelett der Fußfortsätze über Talin, Vinculin und Paxillin verbunden sind [Faul et al., 2007; Löwik et al., 2009], sind sie mit Hilfe von Laminin mit der glomerulären Basalmembran verankert. Erste Studien von Kreidberg et al. 1996 deckten auf, dass eine Integrin-vermittelte Signalübertragung von Podozyt und GBM für eine normale Funktion der Filtrationsbarriere notwendig ist. Sie konnten in konventionellen *Itga3*-Knockout Mäusen eine reduzierte Anzahl von Sammelrohren in der Medulla und erweiterte Kapillaren feststellen. Die glomeruläre Basalmembran war fragmentiert und Podozyten konnten keine Fußfortsätze bilden [Kreidberg et al., 1996]. Ferner zeigten neuere Experimente, dass Mäuse mit einer Podozyten-spezifischen Deletion von $\beta 1$ -Integrinen zwar normal geboren werden, diese allerdings die postnatale Nierenentwicklung nicht vollenden können. Sie entwickeln bereits am ersten Tag nach der Geburt eine Proteinurie und sterben innerhalb einer Woche. Untersuchte man diese Mäuse ultrastrukturell, zeigten diese eine gesplittete GBM und einen Verlust der Podozytenfußfortsätze [Kanasaki et al., 2008]. Analog hierzu konnte eine verminderte Synthese von $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin sowohl bei der diabetischen Nierenerkrankung und FSGS beim Menschen als auch bei mehreren Tiermodellen mit experimenteller Glomerulonephritis festgestellt werden [Regoli & Bendayan, 1997; Chen et al., 2006].

Ein wichtiges Molekül, das in einem Zug mit dem Integrin-Komplex erwähnt werden muss, ist ILK (Integrin-linked kinase), welches ein Mediator für die Signalweitergabe von Integrinen ist. Die Podozyten-spezifische Deletion dieses Signalmoleküls der Integrine führt zu einer postnatalen Proteinurie mit Veränderungen in der GBM und einer progressiven Glomerulosklerose, durch die die Mäuse nach spätestens 15 Wochen sterben [Al-Aouni et al., 2006; Kanasaki et al., 2008]. Man kann daraus schließen, dass sowohl Integrine selbst als auch die ILK-abhängige Signalweitergabe für die postnatale Entwicklung der Niere und deren Funktion als Filtrationsapparat essentiell sind. Ein Verlust der Verankerung führt demnach zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts, was wiederum zu einem Verlust der Fußfortsätze führt.

Ein weiteres wichtiges Ankerprotein zwischen den Podozyten und der GBM ist Dystroglykan (α - und β -Dystroglykan), welches über Utrophin mit dem Aktin der Fußfortsätze verlinkt und über Agrin mit dem Netzwerk der GBM verbunden ist [Löwik et al., 2009; Kretzler, 2002]. Interessanterweise konnte in Tiermodellen eine Korrelation zwischen dem Auftreten einer Proteinurie und der herabgesetzten Expression von Dystroglykan nachgewiesen werden [Raats et al., 2000]. Neuere Ergebnisse von Jarad et al. 2011 zeigten allerdings keine Funktionsstörungen oder morphologische Veränderungen der Niere nach Podozyten-spezifischer Inaktivierung von Dystroglykan. Bei Patienten konnte eine Minimal-Change-Glomerulonephritis, allerdings keine fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS), nach verminderter Dystroglykan-Expression festgestellt werden [Regele et al., 2000].

D. Transkriptionelle Regulation der Podozyten

Bis dato sind Ablauf und Entwicklung der Niere im Allgemeinen gut verstanden, doch sind auch zahlreiche Faktoren an der Bildung und Aufrechterhaltung der Nierenstruktur beteiligt, über deren genaue Einflussnahme noch wenig bekannt ist. Hierbei nimmt die transkriptionelle Regulation in den Podozyten eine zentrale Stellung ein, kann man doch deren Fehlregulation und einen daraus resultierenden Verlust der podozytären Struktur direkt aufeinander zurückführen. Die molekularen Mechanismen in den Podozyten sind jedoch schwer ausfindig zu machen und benötigen eine weitreichendere und detailliertere Ansicht, um die Signalwege aufzuschlüsseln.

Einer der am besten verstandenen Faktoren ist WT1 (Wilms Tumor 1), ein Zinkfingerprotein, welches direkt die Podozytengene *Podxl* (Podocalyxin), *Nphs1* (Nephrin) und *Pax2* (Pax-2) reguliert [Wagner et al., 2004; Palmer et al., 2001; Ryan et al., 1995]. Eine verminderte Synthese von WT1 kann bei Patienten zu einem Nierenblastom (schon im Kindesalter), zum Denys-Drash-Syndrom (mit diffuser mesangialer Sklerose) oder zum Frasier-Syndrom (mit steroid resistenter fokaler Glomerulosklerose) führen [Matsunga, 1981; Pelletier et al., 1991; Barbaux et al., 1997]. Verschiedene Knockout Mausmodelle mit unterschiedlichen *Wt1*-Expressionsspiegeln zeigten u.a. eine diffuse Glomerulosklerose, Albuminurie oder eine halbmondförmige Glomerulonephritis mit reduzierter Menge an Nephrin und Podocalyxin, und bestätigten die gemachten Beobachtungen bei Patienten [Guo et al., 2002; Discenza & Pelletier, 2004]. Während *Wt1*^(-/-)-Mäuse bereits im Uterus sterben, entwickeln heterozygote *Wt1*^(+/-)-Mäuse eine glomeruläre Sklerose mit einer verdickten GBM und einem Verlust der Podozytenfußfortsätze [Menke et al., 2003].

Pax-2 gehört zu den Transkriptionsfaktoren mit einer charakteristischen „paired-box“ als DNA-Bindedomäne. Seine Synthese startet bereits mit der Urogenitalentwicklung und der Bildung des metanephrogenen Mesenchyms, wird aber bereits während der Phase der S-förmigen Körperchen gedrosselt, in erwachsenen Podozyten ist Pax-2 nicht mehr zu finden [Dressler & Douglass, 1992]. Diese Abwesenheit von Pax-2 kann möglicherweise durch eine Repression durch Wt-1 erklärt werden, welches zu diesem Zeitpunkt aktiv ist [Ryan et al., 1995]. Ein Verlust von PAX-2 führt zu einem degenerierten Wolffschen und Müllerschen Gang, und Torres et al. konnten 1995 zeigen, dass *Pax2*^(-/-)-Knockout Mäusen die Nieren vollständig fehlten. Interessanterweise konnte auch eine Interaktion zwischen Pax-2 und Lmx1b nachgewiesen werden, was auf eine gemeinsame Teilnahme in der Signalkaskade schließen lässt [Marini et al., 2005].

Ein zu den Helix-Schleife-Helix-Transkriptionsfaktoren gehörendes und bei der Nierenentwicklung bedeutendes Protein, ist Pod1 (Capsulin/Epicardin/Tcf21), welches sowohl in sich entwickelnden als auch in adulten Podozyten synthetisiert wird [Quaggin et al., 1999]. So sterben *Pod1*^(-/-)-Knockout Mäuse gleich nach der Geburt und zeigen eine hypoplastische bzw. dysplastische Niere mit einer reduzierten Anzahl an Glomeruli und Podozyten [Cui et al., 2005]. Ebenso ist Pod1 auch für die Differentiation von Podozyten und ihren Fußfortsätzen verantwortlich [Quaggin et al., 1999].

FOXC2 (Mfh1) ist ein Transkriptionsfaktor aus der „forkhead/winged-helix“ Familie und verantwortlich für die frühe Entwicklung der Niere und der Aufrechterhaltung der Funktionalität reifer Podozyten [Takemoto et al., 2006]. Nach einer Deletion von *Foxc2* in Mäusen konnten kleinere Nieren und eine reduzierte Anzahl an Glomeruli festgestellt werden; mutierte Glomeruli wiesen erweiterte und blutgefüllte Kapillarschlingen auf und deren Podozyten bildeten keine Fußfortsätze oder Schlitzmembranen aus. Genexpressionsanalysen offenbarten eine verminderte Expression von *Nphs2*, *MafB*, *Cdkn1c*, *Col4a3*, *Col4a4* und *Col4a5* [Takemoto et al., 2006]. Bei Patienten mit einer Haploinsuffizienz für FOXC2 konnte ebenfalls eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion einhergehend mit einer Proteinurie diagnostiziert werden [Yildirim-Toruner et al., 2004].

Ein weiterer bedeutender Transkriptionsfaktor der Podozyten ist MafB (Maf-1, Kreisler), der aufgrund seiner Struktur in die „Leucin-Zipper“-Familie eingeordnet wird [Blank & Andrews, 1997]. In der Niere ist MafB v.a. während der Entwicklung der Podozyten aktiv, wird aber auch noch in adulten Podozyten synthetisiert [Imaki et al., 2000]. Homozygote *MafB*-Knockout Mäu-

se sterben innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt und weisen eine heftige Proteinurie auf, die auf einen Verlust oder der Fusion der Podozytenfußfortsätze zurückzuführen ist. Ferner sind in Mäusen mit zwei mutierten Allelen von *MafB* erniedrigte Spiegel von Podocin, Nephrin und CD2AP messbar [Sadl et al., 2002; Moriguchi et al., 2006].

LIM1 (LHX1) stellt einen LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor dar, der aufgrund seiner Eigenschaften eng mit dem Transkriptionsfaktor LMX1B (s.a. 1.4) verwandt ist. LIM1, welches für die Nierenentwicklung von erheblicher Bedeutung ist, wird bereits während der Komma- und S-förmigen Struktur der Nierenbläschen exprimiert, stellt seine Expression allerdings im erwachsenen Glomerulus wieder ein [Kobayashi et al., 2005]. Untersuchungen von *Lim1*-Knockout Mäusen ergaben, dass ihnen die Nieren und Gonaden fehlten [Shawlot & Behringer, 1995]. Neuere Studien lassen vermuten, dass LIM1 weitere Gene hochreguliert, die für die Differenzierung und Segmentierung von Nephronen zuständig sind, z.B. Proteine des Notch-Signalweges. *Lim1* selbst wird von Pax-2 reguliert [Kobayashi et al., 2005].

1.4 Der Transkriptionsfaktor LMX1B

1.4.1 Struktur und Aufbau von LMX1B

Ein Mitglied der LIM-Homöodomäne-Familie von Transkriptionsfaktoren ist LMX1B (LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktor 1 Beta). Als solches ist es für die Regulierung von Genen verantwortlich, die die Zelldifferenzierung, den Körperbauplan oder die zeit- und gewebsspezifische Expression von Zielgenen bestimmen [Curtiss & Heilig, 1998; Gehring et al., 1994]. Dies trifft auch für die weiteren Vertreter der LMX-Gruppe zu, die sich in sechs Untergruppen aufteilen lässt, zu denen auch das humane LMX1B gehört. Weitere Mitglieder sind *Lmx1b* der Maus, *Lmx1* vom Huhn, *Lmx1.1* und *Lmx1.2* vom Hamster sowie *Lim6* aus *C. elegans* [Hobert & Westphal, 2000].

LMX1B hat eine Größe von ungefähr 7 kb und ist in 8 Exonen organisiert. Das Gen kodiert für ein Protein mit zwei aminoterminalen LIM-Domänen, verantwortlich für Protein-Protein-Wechselwirkungen, einer Homeodomäne in der Mitte, die für die DNA-Interaktion zuständig ist, und einer karboxyterminalen glutamin- und serinreichen mutmaßlichen Transaktivierungsdomäne [McIntosh et al., 2005]. Je nach Spleißvariante erreicht so das fertige Protein eine Länge von

395 bzw. 402 Aminosäuren, wobei auf die beiden LIM-Domänen 51 bzw. 54 Aminosäuren und auf die Homeodomäne 60 Aminosäuren entfallen [Seri et al., 1999; Dunston et al., 2004] (s.a. Abb. 3).

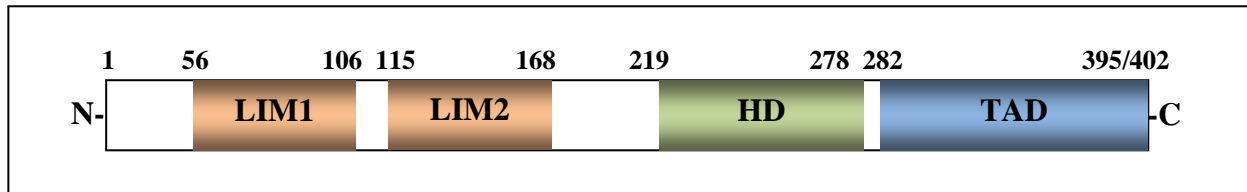


Abb. 3: Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors LMX1B. Das 395 bzw. 402 Aminosäuren lange Transkript von LMX1B beinhaltet zwei N-terminale LIM-Domänen (LIM1 und LIM2), in der Mitte eine Homeodomäne (HD) sowie C-terminal eine mutmaßliche Transaktivierungsdomäne (TAD). Die Zahlen darüber geben die Aminosäure-Positionen an.

Die Abkürzung „LIM“ wurde nach den ersten drei Buchstaben der Gene abgeleitet, in denen dieses Motiv als erstes beschrieben wurde: *lin-11* (*C. elegans*), *isl-1* (Ratte) und *mec-3* (*C. elegans*). Hierbei handelt es sich jeweils um Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei der Ontogenese spielen [Freyd et al., 1990, Karlsson et al., 1990, Way & Chalfie, 1988]. Inzwischen konnte auch gezeigt werden, dass ebenso diverse Protoonkogene, Zytoskelett-Proteine und Transkriptionsfaktoren dieser Gruppe zugeordnet werden können, da sie alle ein einheitliches cysteinreiches Motiv (Konsensus-Sequenz: Cys-X₂-Cys-X₁₆₋₂₃-His-X₂-Cys-X₂-Cys-X₂-Cys-X₁₆₋₂₁-Cys-X₂₋₃-Cys/His/Asp) besitzen [Taira et al., 1995]. Hierbei handelt es sich um eine Zinkbindende Struktur aus zwei Zinkfinger-ähnlichen Modulen, die, im Gegensatz zu klassischen Zinkfingern, nicht an DNA binden, sondern die Bindung an andere Proteine vermitteln [Dawid et al., 1995; Michelsen et al., 1993]. Diese Proteine können Aktivatoren, Repressoren oder aber auch wieder andere Transkriptionsfaktoren sein, wodurch ein inhibierender oder stimulierender Effekt der transkriptionellen Aktivität von LMX1B erreicht werden kann. Bisher sind allerdings nur wenige Proteine bekannt, mit denen LMX1B interagiert: LDB1 (LIM-Domäne bindendes Protein 1, Synonyme CLIM2 oder NLI), bei dem allerdings noch nicht geklärt ist, ob es sich um einen Repressor oder Aktivator handelt [Suleiman et al., 2007; Matthews & Visvander, 2003], E47/Pan1, bei dem die Aktivierung eines Ratten-Insulinpromotors nachgewiesen werden konnte [Dreyer et al., 2000; Jurata & Gill, 1997; German et al., 1992], und der negativ regulierende Co-Faktor RLIM (RING finger LIM-domain binding protein), der den Kontakt mit dem Transkriptions-Repressor-Komplex Sin3A/Histon-Acetylase vermittelt, was zu einer Senkung der Transkriptionsrate führt [Bach et al., 1999].

Die hochkonservierte Homeodomäne besteht aus einem Helix-turn-Helix-Motiv und ermöglicht eine Bindung an DNA-Bereiche von Zielgenen. Diese Domäne wurde zuerst in den homöotischen Proteinen von *D. melanogaster* entdeckt, die über den Grundbauplan des Embryos und die Identität von Körperstrukturen bestimmen [Banerjee-Basu & Baxevanis, 2001; McGinnis et al., 1984]. Das charakteristische Aminosäure-Triplett Thr-Gly-Leu liegt an den Stellen 38-40 der Homeodomäne, wobei die Homeodomäne selbst aus drei α -Helices und einem verlängerten aminoterminalen Arm besteht. Während die dritte Helix sich in die große Furche der DNA senkt und die Mehrzahl der Protein-DNA-Kontakte übernimmt, ragt der aminoterminal Arm der Homeodomäne in die kleine Furche und übernimmt spezifische Bindungen an die DNA [Gehring et al., 1994; Banerjee-Basu & Baxevanis, 2001]. Hierbei konnte anhand von EMSA-Studien („electrophoretic mobility shift assays“) eine Bindung von LMX1B an adenin- und thyminreiche FLAT-Elemente (FLAT-E: TAATTA; FLAT-F: TTAATA) der DNA gezeigt werden [German et al., 1992; Dreyer et al., 1998]. Neueste Daten von Raschta offenbarten eine Regulation von NF- κ B-Zielgenen, z.B. *IL-6*, durch LMX1B, was auf eine funktionelle Interaktion zwischen dem LMX1B-Signalweg und dem NF- κ B-Signalweg hinweist [Raschta, 2009; Rasche et al., 2009].

LMX1B ist an vielen entwicklungsspezifischen Vorgängen beteiligt. So konnte ein erheblicher Einfluss von LMX1B bei der Entwicklung der Gliedmaßen entlang der dorsoventralen Achse belegt werden, wird es doch für die Entwicklung der dorsalen Strukturen benötigt, während es gleichzeitig die ventralen Strukturen unterdrückt. So wurde gezeigt, dass im Huhn nach ektopischer Expression von *Lmx1*, dem orthologen Protein zu LMX1B, im ventralen Mesenchym dort nun Muskeln und Sehnen von dorsalem Charakter entstehen. Es fand eine Konversion von ventralen zu dorsalen Strukturen statt [Vogel et al., 1995; Riddle et al., 1995].

1.4.2 Funktion von LMX1B beim Menschen: Nagel-Patella-Syndrom

Mutationen in *LMX1B* verursachen das sog. Nagel-Patella-Syndrom [NPS; Turner-Kieser-Syndrom; Trauner-Rieger-Syndrom; Anthroonychodysplasie; Fong-Syndrom; Österreicher-Syndrom; Hereditäre Osteo-Onycho-Dysplasie (HOOD-Syndrom); OMIM 161200], eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:50.000 aller Lebendgeburten auftritt [Bongers et al., 2002]. Dabei zeigt NPS ein pleiotropes Erscheinungsbild mit hoher Penetranz, selbst eine inter- und intrafamiliäre Variabilität bezüglich Schwere und Ausbildung der Symptome sind typisch für diese Krankheit [Farley et al., 1999; McIntosh et al.,

2005]. Ein erster Durchbruch in der Erforschung des Nagel-Patella-Syndroms gelang, als Renwick & Lawler 1955 eine Kopplung der Vererbung mit dem ABO-Blutgruppenloкус nachweisen konnten. Allerdings dauerte es mehr als 40 Jahre, bis das für NPS-verantwortliche Gen *LMX1B* identifiziert worden war. Hierbei konnte der Lokus für *LMX1B* in einem 1-2cM langen Bereich auf dem Chromosom 9q34 bestimmt werden [Dreyer et al., 1998; McIntosh et al., 1998; Vollrath et al., 1998].

Mutationen im Gen für *LMX1B* treten am häufigsten in den für die beiden LIM-Domänen (LIM-1: 44%, LIM-2: 38%) und die Homeodomäne (18%) kodierenden Exone auf, nur selten in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne. Bisher wurden mehr als 137 Mutationen in *LMX1B* in der Literatur beschrieben, welche durch Basenaustausche (missense- und nonsense-Mutationen), Deletionen, Insertionen und Translokationen verursacht werden, die jeweils zu einem verkürzten und nicht funktionalen Protein führen [Li et al., 2008; Dunston et al., 2004; Hamlington et al., 2000; Clough et al., 1999]. Ergebnisse von Johnson et al. lassen hierzu vermuten, dass der LIM-2 Domäne eine höhere Relevanz als der LIM-1 Domäne zukommt, da mehr Mutationen in der LIM-1 Domäne als in der LIM-2 Domäne gefunden wurden [Johnson et al., 1997].

Während die charakteristischen fehlgeformten Nägel an Händen (~90%), seltener Fuß, bzw. Aplasien oder Hypoplasien der Patellae (74-92%) namensgebend für diese Krankheit sind, werden auch zahlreiche weitere Symptome bei Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom beschrieben [Bongers et al., 2002]. So besitzen diese mehrere Skelettanomalien wie Exostosen der Darmbeinschaufeln (Iliakalhörner, 70-80%), Fehlbildungen der Ellenbogen durch Radiusköpfchenluxation (70-90%), Hüftdislokationen oder auch Hand- und Fußdeformationen (Klumpfüße) [Hamlington et al., 2001; Knoers et al., 2000; Sweeney et al., 2003]. Im Allgemeinen sind Sehnen, Bänder, Muskeln und Knochen gleichermaßen betroffen [Bongers et al., 2002].

Ferner sind Augenanomalien zu beobachten, die vorwiegend in einem primären Offenwinkelglaukom (~50%) beschrieben werden, seltener erhöhter Augeninnendruck, Pigmentstörungen der Iris (7-10%) oder einer Trübung der Augenlinse [Lichter et al., 1997]. Zu erwähnen sind auch gastrointestinale, neurologische oder auch vasomotorische Symptome, die bei Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom auftreten können. So spielt *LMX1B* im Gehirn eine große Rolle sowohl bei der Entwicklung von mesenzephaler dopaminerger oder auch serotonerger Neuronen, als auch

bei der Differenzierung von afferenten sensorischen Neuronen [Smidt et al., 2000; Ding Y.-Q. et al., 2003].

Weitaus bedeutender für Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom ist die Tatsache, dass bei ~40% der Erkrankten Nierenanomalien auftreten, die von einer leichten Proteinurie bis hin zu chronischem Nierenversagen reichen [Chen et al., 1998; Morello et al., 2001]. Je nach Ausprägung können hier eine heftige Hämaturie, ein Verlust der Podozyten-Fußfortsätze oder der Schlitzmembran, oder Veränderungen der glomerulären Basalmembran auftreten. So zeigt die GBM z.B. eine Verdickung oder Splittung, aber auch Einlagerungen von fibrillären kollagenem Material oder Mottenfraß-ähnliche Aufhellungen [Sweeney et al., 2003; del Pozo & Lapp, 1970; Ben-Bassat et al., 1971; Heidet et al., 2003]; eine korrekte Filtration kann somit nicht gewährleistet werden.

Neben der hohen Expression von *LMX1B* in den Podozyten konnte auch eine Expression in Schilddrüse, Hoden, Duodenum, Skelettmuskulatur und Pankreas-Inseln nachgewiesen werden. Während *LMX1B* in der Gliedmaßenentwicklung nur vorübergehend synthetisiert wird, bleibt in den Podozyten die Synthese von *LMX1B* auch postnatal bestehen. Eine Regulation von mutmaßlichen Zielgenen von *LMX1B* konnte bis heute noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, zeigen doch die Gene *COL4a3*, *COL4a4*, *CD2AP* und *NPHS2* eine normale Expression bei NPS-Patienten, während diese Gene in der *Lmx1b*^(-/-)-Maus tatsächlich herabreguliert sind (s.a. 1.4.3) [Heidet et al., 2003; Rohr et al., 2002].

1.4.3 Funktion von *Lmx1b* bei der Maus: *Lmx1b*-Knockout Modelle

Eine große Hilfe zur Erforschung der Rolle von *LMX1B* war die Entwicklung der konventionellen *Lmx1b*-Knockout Maus. Bei dieser Maus wurden die für die LIM2-Domäne, Homeodomäne und C-terminalen Transaktivierungsdomäne kodierenden Regionen mittels homologer Rekombination entfernt [Chen et al., 1998]. Während allerdings beim Menschen ein dominantes Erscheinungsbild zu Tage tritt, wodurch heterozygote Erbträger am Nagel-Patella-Syndrom erkranken, ist dies bei heterozygoten *Lmx1b*-Knockout Mäusen nicht der Fall und die Tiere zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten [Rohr et al., 2002]. Erst der homozygote Verlust von *Lmx1b* führt zu ähnlichen Krankheitsbildern wie beim erkrankten Menschen, was wohl auf die Präsenz von unterschiedlichen Modifikator-Proteinen in den verschiedenen Systemen zurückzuführen ist.

Die homozygote *Lmx1b*-Knockout Maus stellt aber ein adäquates Mittel zur Erforschung des Nagel-Patella-Syndroms dar, fehlt doch ausreichendes menschliches Material.

Wird *Lmx1b* in der Maus ausgeschaltet, kommt es zu dramatischen entwicklungsspezifischen und strukturellen Veränderungen, weshalb *Lmx1b*^(-/-)-Mäuse bereits innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt sterben [Chen et al., 1998]. Sie zeigen einen vollständigen Verlust dorsaler Gliedmaßenstrukturen, einhergehend mit einer Verdopplung ventraler Strukturen, sowie weitere Skelettmissbildungen an Scapula, Clavicula und im Bereich der Becken- und Schädelknochen [Chen et al., 1998; Dreyer et al., 1998]. Desweiteren scheint *Lmx1b* Regulator der Morphogenese der vorderen Augenabschnitte zu sein, da Mäuse mit homozygotem Gendefekt eine Iris- und Ziliarkörperhypoplasie sowie Defekte der Hornhautstruktur ausbilden [Pressman et al., 2000].

In der Niere konnte eine *Lmx1b*-Expression bereits am Embryonaltag 13,5 in den S-förmigen Körpern und eine fortdauernde Synthese in den Podozyten auch bis nach der Geburt nachgewiesen werden. Ein Ausfall von *Lmx1b* führt hier zu einem Verlust der Fußfortsätze und der Schlitzmembran sowie zu einer Splittung der glomerulären Basalmembran bzw. einer Verminderung der Fenestrierung des Endothels [Miner et al., 2002; Rohr et al., 2002]. Ferner konnte eine Herabregulierung von *Col4a3*, *Col4a4*, *Cd2ap* oder *Nphs2* festgestellt werden, was allerdings nicht kohärent zu den Beobachtungen bei Patienten ist, wo diese Gene nicht betroffen zu sein scheinen [Heidet et al., 2003; Morello et al., 2001; Rohr et al., 2002].

Einen tieferen Einblick in die Nierenveränderungen nach Inaktivierung von *Lmx1b* war die Entwicklung der Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Maus, bei welcher die für die Homeodomäne kodierende Region ausgeschnitten wurde, was zu einem nicht funktionsfähigen Protein führte [Suleiman, 2007]. Diese Knockout Mäuse bildeten bereits nach 5 Tagen eine heftige Proteinurie und starben nach etwa 2 Wochen an ihren zahlreichen Nierenanomalien. Strukturelle Untersuchungen ergaben eine Verdickung der GBM, einen Verlust der Fußfortsätze und die Bildung einer fokalen segmentalen Glomerulosklerose. Ebenso zeigten diese Mäuse keine Herabregulierung von *Col4a3*, *Col4a4* oder *Nphs2*, was dem menschlichen Krankheitsbild entspricht und somit eine Verbesserung des konventionellen Systems ist [Suleiman et al., 2007]. Ferner konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine primäre Bildung von Podozyten-Fußfortsätzen beobachtet werden, die im späteren Verlauf wieder verloren gingen, was auf eine mögliche Beteiligung von *Lmx1b* zur Aufrechterhaltung der Struktur hinweisen könnte.

1.5 Zielsetzung

Eine Beteiligung von LMX1B an Entwicklungsvorgängen ist unumstritten, gibt es doch zahlreiche fehlentwickelte Strukturen, die auf einen LMX1B-Defekt zurückzuführen sind. Wie diese Vorgänge allerdings ablaufen ist noch weitgehend unerforscht. Ein geeignetes Mittel hierfür war die Entwicklung der konventionellen *Lmx1b*-Knockout Maus, anhand derer man zahlreiche strukturelle und molekulare Veränderungen bei einem *Lmx1b*-Defekt untersuchen konnte. Übereinstimmend bei Patienten und Knockout Mäusen konnten so Veränderungen der Augen, Gliedmaßen und der Nierenstruktur nachgewiesen werden. Durch die Entwicklung der Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Maus war eine nähere Untersuchung der Nierenveränderungen möglich, wodurch allerdings auch eine primäre Entwicklung der Podozyten festgestellt werden konnte, während die Podozyten sekundär wieder verloren gingen. Das brachte die Fragestellung mit sich, ob *Lmx1b* auch für die Aufrechterhaltung der podozytären Struktur verantwortlich ist. Hierfür wurde eine induzierbare Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Maus entwickelt, bei der *Lmx1b* zum gewünschten Zeitpunkt speziell in den Podozyten ausgeschaltet werden kann.

Sollte es sich herausstellen, dass *Lmx1b* tatsächlich für die Aufrechterhaltung der podozytären Struktur verantwortlich ist, soll in weiteren strukturellen, biochemischen und zellbiologischen Methoden der molekulare Mechanismus aufgedeckt werden, der zu einem Verlust der Nierenstruktur führt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Sigma
Acidofix Fixierer	Agfa
38% Acrylamid/2% Bisacrylamid	Roth
Acrylamid 4K Lösung	AppliChem
Agarose	Biozym
α - ³² P-dCTP	MP Biomedicals
Aprotinin	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Ampicillin	Serva
ATP	Sigma
Bacto-Agar	Becton Dickinson
Bacto-Hefeextrakt	Becton Dickinson
Bacto-Trypton	Becton Dickinson
Bisbenzimid (Hoechst 33258)	Sigma
Brij [®] 97	Sigma
Bromphenolblau	Serva
BSA	Sigma
Calciumchlorid	Roth
Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Coomassie Brilliant Blau G 250	Serva
Coomassie Brilliant Blau R 250	Serva
cRGD (zyklisches RGD-Peptid)	Bachem
DEAE-Dextran	Sigma
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP's)	Fermentas
Dikaliumhydrogensulfat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogensulfat	Merck
DMEM: Dulbecco's modified Eagle Medium; high Glucose	PAA

Doxyzyklin	PAA
EGTA	Sigma
Eosin G	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Eukobrom Entwickler	Tetenal
Ficoll 400	Roth
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
Formaldehyd	J.T. Baker
Formaldehyd-Lösung (für EM)	Merck
Geneticin (G418)	Invitrogen
Glutaraldehyd 25% (für EM)	Serva
Glukose	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
Harnstoff	Merck
HEPES	Fluka
Histoacryl®	Braun Aesculap
Hygromycin	Invitrogen
Immersol™ 518F	Carl Zeiss
Isopropanol	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Fermentas
Kaliumazetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
D-Kaliumgluconat	Sigma
Kaliumhydroxid	Merck
Ketamin 10%	WDT
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch
Kollagenase A	Roche Diagnostics
Komplettes Freund's Adjuvans	Sigma
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III-Marker	Fermentas

Leupeptin	Roth
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma
Lithiumchlorid	Merck
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
D-Mannitol	Fluka
Mayer's Hämlaunlösung	Merck
β -Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Merck
Methylenblau	Merck
β -NAD	Sigma
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	Merck
Narcoren	Merck
Natriumazetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdesoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumphosphat	Merck
Dinatriumcitrat-Dihydrat	J.T. Baker
Natronlauge	Merck
Nonidet P40	Fluka
Nystatin	Sigma
ortho-Phosphorsäure 85%	Merck
Osmiumtetroxid 25%	Plano
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
Paraformaldehyd	Merck
Paraplast® Plus Tissue Embedding Medium	Sherwood Medical
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) 100x	Gibco
Periodsäure	Merck
Phenol	Roth
Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF)	Sigma

ΦX174 DNA/ <i>Bsu</i> R I-Marker	Fermentas
Pikrinsäure	Sigma
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma
Poly-L-Ornithin	Sigma
Prestained Protein Marker, broad range	New England Biolabs
Rinder Serum Albumin (BSA)	Sigma
Roti-Quant [®]	Roth
RPMI 1640-Medium	PAA
Salzsäure	Merck
Schiff's Reagenz	Roth
Schwefelsäure	Merck
Spermidin	Sigma
Sucrose	Merck
SYBR Green I Nucleic Acid Gel Strain	Roche
TEMED	Serva
Thioglykolat	Sigma
Tris	USB
Triton X-100	Merck
Trypsin-EDTA	PAA
Tween 20	Serva
Western Lightning Chemiluminescence Reagent	Perkin Elmer
Xylazin 2%	Cp-Pharma
Xylol	VWR

2.1.2 Kits

DNA Extraction Kit	Fermentas
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche
iScript [™] cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad
NucleoSpin [®] RNA II	Machery-Nagel
NucleoSpin [®] Tissue Kit	Machery-Nagel
Wizard [®] <i>Plus</i> Midipreps DNA Purification System	Promega

2.1.3 Enzyme

Entsprechende 10x Puffer und Reaktionszusätze wurden von den jeweiligen Firmen bezogen.

<i>Bam</i> H I	NEB
Hot Star Taq DNA-Polymerase	Qiagen
Klenow-Polymerase	NEB
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fermentas
Proteinase K	Roth
RNAse A	Roth

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

0,1 ml Röhrchen in 4er Streifen mit Deckel	Corbett Research
0,2 ml Reaktionsgefäße	Biostep
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
15 ml Röhrchen	Sarstedt
50 ml Röhrchen	Sarstedt
Autoklavierband	VWR
Cellophan	Roth
Chromatographiepapier „3MM Chr“	Whatman
Deckgläser	Roth
Drei-Wege-Hahn „Discofix C“	Braun
Dynabeads M-450 Epoxy (Durchmesser 4,5 µm)	Invitrogen
Einfrierröhrchen	VWR International
Einmal-Kanülen 21G x 1½ (0,8 x 40 mm)	Braun
Einmal-Kanülen 27G x ¾ (0,4 x 20 mm)	Terumo
Faden Terylene USP 2/0 DS-18, 24 x 50 cm	SERAG Wiessner
Fettstift	Dako
Film Kassetten: Universal 100 mit Verstärkerfolie	rego
Fluoreszenzmarker	Stratagene
Gewebekulturflaschen	Greiner bio-one
Gewebekulturplatten	Greiner bio-one

Gewebekulturschalen	Greiner bio-one
Gitterformen (Histosette)	Simport
Glasobjektträger	Langenbrinck
Glaswaren/Plastikwaren: Bechergläser usw.	Roth
Handschuhe Latex	Kimberley-Clark
Handschuhe Nitril	Roth
Haushaltstücher	Fripa
Klarsichtfolie	Seitz
Kreppband	Tesa
Küvetten	Sarstedt
Lochplatten: 6-, 12-, 24-Loch (für Zellkultur)	Sarstedt
Mikrotomklingen	Thermo Electron Corporation
Neubauer-Zählkammer mit Deckglas: 0,100 mm/0,0025 mm ²	BRAND
Nylonmembran „Parablot NY plus“	Macherey-Nagel
Papierfilter	Schleicher & Schüll
Parafilm	American National Can
Paraflexformen	Vitri
Pasteurpipetten aus Glas	Brand
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt
Porablot PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße)	Macherey-Nagel
Präparierbesteck	Braun
Quarzküvette „Suprasil“	Hellma
Röntgenfilm Super RX	Fujifilm
Serologische Pipetten	Sarstedt
Silikonspray	Bauhaus Profi Depot
Skalpellklingen	BAYHA
Spritzen (steril)	Braun
Sterilfilter (0,22 µm)	VWR
Wattestäbchen	Goldhand
Western Lightning Chemoluminescence Reagent	Perkin Elmer
Zellschaber	BD Biosciences
Zellsieb 100 µm Nylon	BD Falcon

Zentrifugenröhrchen: 15 ml und 50 ml

Sarstedt

Zentrifugenröhrchen: 12 ml

Techno Plastic Products

2.1.5 Geräte und Instrumente

Agarosegelelektrophorese Dokumentationssystem „Gel Max“

Intas

Agarosegelelektrophorese Midisystem „Easy-Cast“

Owl Scientific

Agarosegelelektrophorese Minisystem „Horizon 58“

GIBCO BRL

Autoklav „Systec 5050 ELV“

Systec

Autoklav Vakuklav[®] 30-B

Mela

Blutdruckmessgerät

Erka

Bunsenbrenner

Usbeck

CMV-E: Dreharm für Eppendorfreaktionsgefäße

Fröbel Labortechnik GmbH

Drehrad für Eppendorfreaktionsgefäße

Universitätswerkstatt Regensburg

DMC-2 Kamera (für Fluoreszenzmikroskop-Axioskop)

Polaroid

Echtzeit-Thermocycler „RotorgeneTM 3000“

corbett research

Einbettautomat

Shandon-Elliott LTD

Eismaschine „AF-10“

Scotsman

EPC-7-ähnlicher Patch-Clamp Verstärker

U. Fröbe und R. Busche, Institut für Physiologie, Freiburg

Feinwaage „Mettler H10w“

Mettler

Fluoreszenzmikroskop „Axioskop 20“

Zeiss

Fujifilm Phosphoimager FIA-5000

Fuji Film

Gefrierschränke bis -20°C

Privileg

Gefrierschränke bis -80°C

Heraeus

Heizblock „Bioblock Scientific“

Barnstead

Heizblock „VLM LS 1“

VLM

Heizplatte

MEDAX

Heizplatten mit Magnetprüher „MR3001“

Heidolph

Imaging Plate 2025

Fuji Film

Inkubationsschrank „Kelvitron t“

Heraeus

Inkubationsschüttler „Unitron“

Infors

Kompressor „Jun air“	Jun-air
Konfokalmikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Kühlschränke	Privileg
Kühlzentrifuge “Avanti [®] J-26 XP” mit Rotor JLA-16250	Beckman Coulter
Kühlzentrifuge “Jouan BR 4”	Jouan
Kühlzentrifuge „Multifuge 3 SR+“	Heraeus
Kühlzentrifuge “Sigma 3K20“ mit Rotor Nr. 12154	Braun
Magnet zur Zellseparation „BD I Magnet“	BD Biosciences
„Mastercycler Gradient“	Eppendorf
Messgerät für Radioaktivität	Berthold
Metabolische Käfige „MMC 100“	Hatteras Instruments
Mikroskop „Nikon Eclipse TS 100“	Nikon
Mikrotom „Leica RM 2255“	Leica Mikrosysteme
Mikrowelle „Privileg 8018 E“	Privileg
Paraffingießautomat „Leica EG 1150 H“	Leica
Paraflexformen	Vitri [®]
pH-Meter „766 Calimatic“	Knick
Pipetten	Gilson
Pipetten (für RNA)	RAININ
Pipettierhilfe „Pipetboy acu“	Integra Biosciences
Phospho-Imager “FLA-5000”	Fuji
Scanner DUOSCAN f40	Agfa
Schüttler	Heidolph
Schwanenhalslampe	Schott
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-System	Hoefer
Spannungsgeber „Standard Power Pack P 25“	Biometra
Spektralphotometer „U-2000“	Hitachi
Sterilbank	Heraeus
Stereomikroskop	Wild
Stoppuhr	Macherey-Nagel
Thermomixer 5436 für Reaktionsgefäße	Eppendorf
Thermocycler „Mastercycler gradient“	Eppendorf
Thermocycler „My-Cycler“	Biorad
Tischzentrifuge „Biofuge pico” mit Rotor Sorvall 3329	Heraeus

Trockenschrank	Heraeus
Vortexer „Vortex Genie 2“	Scientific Industries
Waage „RL 1500 S“	Sartorius
Wärmeschrank	Memmert
Wasseraufbereitungsanlage „Seralpur Pro 90 CN“	Seral
Wasser-Transferkammer „TE 62“ (Tank-Blot)	Hoefer
Zellkultur-Arbeitsbank: Heraeus Lamin Air HA 2448 GS	Heraeus
Zellkultur-Brutschrank: APT. line TM CB	Binder

2.1.6 Genchip

Agilent	Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik, Regensburg
---------	--

2.1.7 Software

Adobe Photoshop	Bildbearbeitung
File Maker Pro 6	Datenbank
Image Pro Express	Bildbearbeitung am Fluoreszenzmikroskop „Axioskop 20“
Microsoft Exel	Erstellen von Diagrammen
Microsoft Word	Textverarbeitung
Primer Express 2.0	Berechnung der Schmelztemperatur bei der Konzipierung von Primern
Rotor Gene 6	Analyse der Echtzeit-PCR
Vector NTI	Software zur Sequenzanalyse

2.1.8 Internetdatenbanken

NCBI	Datenbank für cDNA-, mRNA- und Aminosäuresequenzen
Pubmed	Literaturrecherche

2.1.9 Antikörper

Antikörper	gerichtet gegen	Spezies	mono-/polyklonal	Verdünnung	Quelle
193_67 (#167)	LMX1B	Maus, Hybridom	monoklonal	1:10 WB 1:100 IZ	Daniel Heudobler; Suleiman et al., 2007
9E10 (#297)	c-Myc	Maus, Hybridom	monoklonal	1:3 WB	Evan et al., 1985
anti-E-Cadherin (#138)	E-Cadherin	Kaninchen	polyklonal	1:100 WB	R. Kemler
anti-c-myc (#84)	c-myc	Maus	monoklonal	1:100 WB	Dunn
anti-Pan-Cadherin (#291)	Pan-Cadherin	Kaninchen	polyklonal	1:100 WB	Sigma
anti-Rac1 (#224)	Rac1	Kaninchen	polyklonal	1:100 WB	Santa Cruz
anti-ZO-1 (#225)	ZO-1	Kaninchen	polyklonal	1:100 WB	Zymed
anti-Ezrin (#246)	Ezrin	Maus	monoklonal	1:4.000 WB	Sigma
8-4 (#247)	Integrin $\alpha 3$	Kaninchen	polyklonal	1:100 WB	R. Hynes
anti-Rho 8 (#371)	Rho 8	Ziege	polyklonal	1:100 WB	Santa Cruz
anti-Cyclin E (#372)	Cyclin E	Kaninchen	polyklonal	1:200 WB	Santa Cruz
anti-p15 (#373)	p15	Kaninchen	polyklonal	1:200 WB	Santa Cruz
anti-p16 (#374)	p16	Maus	monoklonal	1:100 WB	Santa Cruz
anti-p18 (#375)	p18	Kaninchen	polyklonal	1:200 WB	Santa Cruz
anti-p19 (#376)	p19	Kaninchen	polyklonal	1:200 WB	Santa Cruz
anti-p21 (#377)	p21 (WAF1/Cip1)	Kaninchen	polyklonal	1:200 WB	Santa Cruz
anti-p27 (#378)	p27	Kaninchen	polyklonal	1:200 WB	Santa Cruz
anti-p57 (#379)	Kip2 p57	Kaninchen	polyklonal	1:200 WB	Santa Cruz
anti-Myt 1 (#380)	Myt 1	Kaninchen	polyklonal	1:200 WB	Santa Cruz
anti-Wee1 (#381)	Wee 1	Kaninchen	polyklonal	1:200 WB	Santa Cruz
A 2066 (#426)	Aktin (α -Aktin)	Kaninchen	polyklonal	1:2.500 WB	Sigma
3862 (#428)	ILK	Kaninchen	polyklonal	1:1.000 WB	Cell Signaling
3285 (#429)	FAK	Kaninchen	polyklonal	1:1.000 WB	Cell Signaling
9462 (#430)	β -Catenin	Kaninchen	polyklonal	1:1.000 WB	Cell Signaling
610227 (#432)	P-Cadherin	Maus	monoklonal	1:250 WB	BD

Tab. 1: Primärantikörper: IZ: Verwendung für Immunzytochemie; WB: Verwendung für Western Blot

Antikörper	gerichtet gegen	Spezies	mono-/polyklonal	Verdünnung	Quelle
HRP-anti-Kaninchen-IgG (#14)	Kaninchen IgG	Ziege	polyklonal	1:20.000 WB	Sigma
HRP-anti-Maus-IgG (#15)	Maus IgG	Ziege	polyklonal	1:10.000 WB	Sigma
HRP-anti-Ratte-IgG (#421)	Ratte IgG	Ziege	polyklonal	1:20.000 WB	Dianova
HRP-anti-Ziegen-IgG (#369)	Ziegen IgG	Kaninchen	polyklonal	1:80.000 WB	Sigma
FITC-anti-Maus-IgG (#17)	Maus IgG	Ziege	polyklonal	1:200 IZ	Cappel
FITC-anti-Kaninchen-IgG (#16)	Kaninchen IgG	Ziege	polyklonal	1:200 IZ	ICN Biomedicals
Cy3-anti-Maus-IgG (#266)	Maus IgG	Ziege	polyklonal	1:300 IZ	Jackson Immuno Research/Dianova
Cy3-anti-Kaninchen-IgG (#253)	Kaninchen IgG	Ziege	polyklonal	1:400 IZ	Jackson Immuno Research/Dianova

Tab. 2: Sekundärantikörper: IZ: Verwendung für Immunzytochemie; WB: Verwendung für Western Blot

2.1.10 Oligonukleotide

A. Verwendung zur Genotypisierung

Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

Name	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur
Cre-F1	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG	60°C
Cre-R1	CAGGGTGTATAAGCAATCCC	60°C
Lmx1b (5'-lox)	AGGCTCCATCCATTCTTCTC	57°C
Lmx1b (3'-lox)	CCACAATAAGCAAGAGGCAC	57°C

Tab. 3: Primersequenzen zur Genotypisierung

B. Verwendung für die Echtzeit-PCR

Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen MWG Biotech und Metabion bezogen. Schmelztemperaturen wurden mit dem Programm „Primer Express Software“ (Applied Biosystems) berechnet.

Name	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur
mLmx1b F4	CAG CAG CGA AGA GCT TTC AA	57,3°C
mLmx1b R4	GTC TCT CGG ACC TTC CGA CA	61,4°C
mFasL F1	TGG TTC TGG TGG CTC TGG TT	60,0°C
mFasL R1	CAC GGA GTT CTG CCA GTT CC	63,0°C
mTnfrs9 F1	GCC AGG AGC TAA CGA AGC AG	63,0°C
mTnfrs9 R1	GGT CGA CAG ACG CCA GTA CC	65,0°C
mBcl2l11 F1	TGG CCA AGC AAC CTT CTG A	57,0°C
mBcl2l11 R1	GCT GCA ATT GTC CAC CTT CTC	61,0°C
mNphs1 F1	GAC CCC CTG TCA TTG ATT GG	59,4°C
mNphs1 R1	TGG CTA TGC AGG GTA GCT CC	61,4°C
mNphs2 F1	TGG AAG CTG AGG CAC AAA GAC	59,8°C
mNphs2 R1	CTT CTG CAG CAA TCA CCC G	58,8°C
mCol4a3 F1	AAC ACC AGC TCT GAT GCC AAT	59,4°C
mCol4a3 R1	ACC TTC ACA GAC GGT GCA TCT	61,3°C
mCol4a4 F1	GGC AGG CAC TGA TGT CAC C	61,6°C
mCol4a4 R1	CTG GCA TTC AAC GAA CGG T	57,3°C
mIfna F3	GAC CAG CAG CAT TGG CAA TAT	57,9°C
mIfna R3	CAC TGC CAG GAC CAT TAG GAA	59,8°C
mIfnb F1	CAG GTG GAT CCT CCA CGC	60,5°C
mIfnb R1	GAG AGG GCT GTG GTG GAG AA	61,4°C
mIfng F1	CTG CGG CCT AGC TCT GAG AC	63,5°C
mIfng R1	GAG GAA GAG CTG CAA AGC CA	59,4°C
mCD80 F1	GCC TTG CCG TTA CAA CTC TCC	63,3°C
mCD80 R1	CGG TTC TTA TAC TCG GGC CA	60,5°C
mCD86 F1	GAT CAA GGA CAT GGG CTC GTA	61,3°C
mCD86 R1	GTT GGC GAT CAC TGA CAG CTC	63,3°C
mTlr1 F1	CTC TTC GGC ACG TTA GCA CTG	61,8°C
mTlr1 R1	ACG GAA TTC TCT TTT CGA CGG	57,9°C
mTlr2 F1	CCC CTC GGA GTC AGA CGT AGT	63,7°C
mTlr2 R1	GGG ATA TGC AAC CTC CGG A	58,8°C

mTlr3 F1	TGG TCC CCA GCC TTC AAA G	58,8°C
mTlr3 R1	ACG AAG AGG GCG GAA AGG T	58,8°C
mTlr4 F1	GAT GGA AAA GCC TCG AAT CCT	57,9°C
mTlr4 R1	TCC AAG TTG CCG TTT CTT GTT	55,9°C
mTlr5 F1	CCA CCG AAG ACT GCG ATG A	58,8°C
mTlr5 R1	GTG ACC GTG CAC AGG ATG AA	59,4°C
mTlr6 F1	TCT GCA ACA TGA GCC AAG ACA	57,9°C
mTlr6 R1	CAA AGT GGA AAC TCC CCA CG	59,4°C
mTlr7 F1	CCT TTG AAT GCA GAC TGC CAC	59,8°C
mTlr7 R1	ACG GCC AGA GTT CAC TGC C	61,0°C
mTlr8 F1	CAA CCA TCG TCA ACT GCA TGA	57,9°C
mTlr8 R1	GGC TGA GAA GTG CCC CTT CT	61,4°C
mTlr9 F1	TCG TGG TGT TCG ATA AGG CA	57,3°C
mTlr9 R1	CAC CCG CAG CTC GTT ATA CA	59,4°C
mIl6 F1	CTG CAA GAG ACT TCC ATC CAG TT	60,6°C
mIl6 R1	TTG TCA CCA GCA TCA GTC CC	59,4°C
mIl10 F1	CGC TGT CAT CGA TTT CTC CC	59,4°C
mIl10 R1	CAC CTG CTC CAC TGC CTT G	61,0°C
mIl1b F1	AAG GAG AAC CAA GCA ACG ACA	57,9°C
mIl1b R1	TTC TTT GGG TAT TGC TTG GGA	55,9°C
mIrf1 F1	AGC TGG GCC ATT CAC ACA G	59,5°C
mIrf1 R1	AGT TCA TGG CAC AAC GGA AGT	59,4°C
mIrf2 F1	TGT CAC CTC CAA CAA GCC AG	60,5°C
mIrf2 R1	TGT AAG GCA TCG GAC AGC TCT	61,3°C
mIrf3 F1	TTC CTA AAC CCT GCA CCC C	59,5°C
mIrf3 R1	CGA ACT CCC ATT GTT CCT CAG	61,3°C
mIrf9 F1	CCA GCA GGA ACC CTC CCT A	61,6°C
mIrf9 R1	TGA TAC TTC GCT TGC ATG GTG	59,4°C
mIsg15 F1	TTG CCC AGA AGA TTG GTG TG	57,3°C
mIsg15 R1	GGT AAG ACC GTC CTG GAG CA	61,4°C
mS9 F1	GCA AGA TGA AGC TGG ATT AC	55,3°C
mS9 R1	GGG ATG TTC ACC ACC TG	55,2°C

Tab. 4: Primersequenzen für Echtzeit-PCR

2.1.11 Säugerzelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle/Referenz
9E10	Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper gegen das humane c-Myc-Protein sezerniert	American Type Culture Collection; Evan et al., 1985
HtTA-1	HeLa-Zellen (humane epitheliale Zervixkarzinomzellen) mit konstitutiver Synthese des Tetrazyklin-Transaktivators (tTA)	H. Bujard (BZH, Heidelberg); Gossen und Bujard, 1992
HtTA-1/myc-LMX1B	HeLa-Zellen, die unter Verwendung des Tet-off-Systems induzierbar das LMX1B-Protein synthetisieren	C. Rohr (Universitätsklinikum Innere Medizin III, Heidelberg)
LtTA-1/myc-LMX1B	LLC-PK ₁ -Zellen (Nierenepithelzellen aus Schwein), die unter Verwendung des Tet-off-Systems induzierbar das LMX1B-Protein synthetisieren	C. Rohr (Universitätsklinikum Innere Medizin III, Heidelberg); Hull et al., 1976

2.1.12 Mauslinien

Die verwendeten Mauslinien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in einem speziell-pathogenfreien Bereich gehalten (SPF-Einheit) und auf den Hintergrund von Bl/6-Mäusen verpaart.

Mauslinie	Beschreibung	Bezugsquelle
<i>Lmx1b</i> ^(+/-)	Konstitutionelle Elimination der Exone 3-7 von <i>Lmx1b</i>	R. Johnson (MD Anderson Cancer Center, Houston, USA)
<i>Lmx1b</i> ^{2loxP}	<i>loxP</i> -Stellen jeweils ober- und unterhalb der Exone 4 und 6	R. Johnson (MD Anderson Cancer Center, Houston, USA)
P2.5-Cre	Gen für Cre-Rekombinase unter der Kontrolle von 2.5 kbp des humanen <i>NPHS2</i> -Promotors	L. Holzman (University of Michigan, Ann Arbor, USA)
P2.5-rtTA	Gen für reversen tetrazyklin-abhängigen	J. Kopp (NIH, Bethesda, USA)

	Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle von 2.5 kbp des humanen <i>NPHS2</i> -Promotors	
LC-1	Luciferase- und Cre-Gene werden gemeinsam über einen bidirektionalen Tet-Operator reguliert	H. Bujard (ZMBH, Heidelberg)

2.1.13 Medien, Lösungen, Puffer

A. Isolierung genomischer DNA aus Gewebe und Genotypisierung

Verdau-Lösung:

- 100 mM Tris pH 8,0
- 5 mM EDTA
- 0,2% SDS
- 200 mM NaCl
- 200 µg/ml Proteinase K (frisch zugeben)

dNTP's (10 mM):

- 10 µl dATP (100 mM)
- 10 µl dTTP (100 mM)
- 10 µl dCTP (100 mM)
- 10 µl dGTP (100 mM)
- auf 100 µl H₂O

TE-Puffer:

- 10 mM Tris-HCl pH 7,4
- 1 mM EDTA pH 8,0

Denaturierungslösung:

- 1,5 M NaCl
- 0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung:

- 1,5 M NaCl
- 0,5 M Tris-HCl pH 7,2
- 1 mM EDTA

20x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ -Citrat → mit 1 M HCl auf pH 7,0 einstellen
Hybridisierungslösung:	5% SDS 1% BSA 1 mM EDTA pH 8,0 25 mM Natriumphosphat pH 7,2 100 mM NaCl
Waschlösung:	0,2x SSC 0,1% SDS
Restriktionsverdau:	0,1 mg/ml BSA 1 mM Spermidin 1x <i>Bam</i> H I-Puffer 50 U <i>Bam</i> H I 10 µg genomische DNA → mit H ₂ O auf 40 µl auffüllen

B. Kultur von Bakterien

LB-Medium:	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl → mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
------------	--

C. Agarosegelelektrophorese

5x Probenpuffer:	0,125% Bromphenolblau 15% Ficoll 400 50 mM EDTA pH 8,0
------------------	--

	0,5% SDS
50x TAE-Puffer:	2 M Tris 0,1 M EDTA → mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen
DNA-Standard:	40 µl Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker (0,5 mg/ml) 40 µl ΦX174 DNA/ <i>Bsu</i> R I (<i>Hae</i> III) Marker (0,5 mg/ml) 400 µl 5x Probenpuffer 1520 µl H ₂ O

D. Zellkultur

10x PBS:	1,4 M NaCl 100 mM K ₂ HPO ₄ → mit 100 mM KH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 titrieren
PBS-Lysepuffer:	1x PBS 1% Triton-X100
Medium für adhärenente Zellen:	500 ml DMEM-Medium 10% FCS
Kontrolllösung; pH 7,4: (Patch-Clamp)	1,3 mM CaCl ₂ 5 mM Glucose 5 mM HEPES 1,6 mM K ₂ HPO ₄ 0,4 mM KH ₂ PO ₄ 15 mM Mannitol 1 mM MgCl ₂ 135 mM NaCl → in H ₂ O

Glucose-10-Lösung; pH 7,4: (Patch-Clamp)	1,3 mM CaCl_2 10 mM Glucose 5 mM Hepes 1,6 mM K_2HPO_4 0,4 mM KH_2PO_4 10 mM Mannitol 1 mM MgCl_2 135 mM NaCl → in H_2O
Pipettenlösung; pH 7,4: (Patch-Clamp)	3 mM ATP 0,726 mM CaCl_2 1 mM EGTA 5 mM Glucose 95 mM Kaliumgluconat 30 mM KCl 2,38 mM MgCl_2 4,8 mM Na_2HPO_4 1,2 mM NaH_2PO_4 → in H_2O

E. Immunzytochemie/Immunhistochemie

4% PFA-Lösung:	4g Paraformaldehyd → Unter Rühren bei $\sim 50^\circ\text{C}$ in 80 ml H_2O und 4 Tropfen 1 M NaOH lösen und abkühlen lassen. Nach Zugabe von 10 ml 10x PBS mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen und mit H_2O auf 100 ml auffüllen.
Hochsalz-PBS:	1x PBS 270 mM NaCl
Blockierungslösung:	1x PBS

	2% BSA
	0,1% Triton X-100
Permeabilisierungslösung:	1x PBS
	0,25% Triton X-100
Eindeckmittel:	1x PBS
	40% Glyzerin
	→ vor Gebrauch sterilfiltrieren
Färbelösung Hoechst 33258:	50 mg Bisbenzimid in 10 ml H ₂ O
	→ dunkel aufbewahren

F. Arbeiten mit Proteinen

Eichlösungen:	BSA in den Konzentrationen 0/0,1/0,25/0,5/1,5/5 µg/µl
4x Lower Tris:	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	0,4% SDS
4x Upper Tris:	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	0,4% SDS
5x SDS-Probenpuffer:	625 mM Tris-HCl pH 6,8
	50% Glyzerin
	12,5% SDS
	0,00625% Bromphenolblau
	12,5% β-Mercaptoethanol
10x Laufpuffer:	0,25 M Tris
	1,9 M Glycin
	1% SDS

10% Trenngel:	9,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid 7 ml 4x Lower Tris 16 µl TEMED 78 µl 10% APS 11,6 ml H ₂ O
4% Sammelgel:	1,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid 2,5 ml 4x Upper Tris 10 µl TEMED 50 µl 10% APS 6,1 ml H ₂ O
Coomassie-Färbelösung:	0,01% Coomassie Brilliant Blau G250 5% Ethanol (95%ig) 10% Phosphorsäure (85%ig) → Zuerst 100 mg Coomassie Brilliant Blau G250 in 50 ml Ethanol (95%) lösen, dann 100 ml Phosphorsäure (85%) zugeben und auf 1 l mit H ₂ O auffüllen.
Entfärbelösung:	50% Methanol 10% Essigsäure
Transfer-Puffer:	50 mM Tris 384 mM Glycin 20% Methanol 0,01% SDS
Blockierlösung:	1x PBS 0,5% Tween 20 5% Magermilchpulver
Antikörperlösung:	1x PBS 0,5% Tween 20 5% Magermilchpulver

Waschlösung:	1x PBS 0,5% Tween 20
Brij [®] -Puffer:	10 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA pH 8,0 0,875% Brij [®] 97 0,125% Nonidet P40 → Proteinase-Inhibitoren vor Gebrauch frisch zugeben: 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 0,5 mM PMSF
Zelllysepuffer A: (für zytosolische Extrakte)	10 mM KCl 10 mM Hepes pH 7,9 1,5 mM MgCl ₂ 0,625% Nonidet P40 → Proteinase-Inhibitoren vor Gebrauch frisch zugeben: 1 mM DTT 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 0,5 mM PMSF
Kernlysepuffer B: (für Kernextrakte)	20 mM Hepes pH 7,9 10% Glyzerin 0,4 M KCl 0,4% Triton X-100 5 mM EDTA pH 8,5
Lysepuffer G: (für globuläres Aktin)	1% Triton X-100 20 mM Tris pH 7,4 5 mM EGTA pH 7,4 20 mM NaF

25 mM Natriumpyrophosphat

10 mM DTT

0,5 mM PMSF

2 µg/ml Leupeptin

2 µg/ml Aprotinin

Lysepuffer F:

(für fibrilläres Aktin)

1% Triton X-100

6 M Harnstoff

1x PBS

G. Arbeiten mit Mäusen

Narcoren:

Narcoren (160 mg/ml) wird 1:50 mit 0,9% NaCl verdünnt

2% Glutaraldehyd/1x PBS:

25% Glutaraldehyd wird mit 1x PBS verdünnt

Heparinlösung:

Heparin-Natrium-2500 (5.000 IE/ml) wird 1:4 mit 0,9% NaCl verdünnt

Natriumazidlösung (NaN_3):

Natriumazid (10%) wird mit 1x PBS auf eine Endkonzentration von 0,02% NaN_3 verdünnt

Richardson-Färbelösung:

Lösung A: 1% Methylenblau + 1% Borax-Lösung (= 1 g Di-Natriumtetraborat x 10 H_2O in 100 ml H_2O)

Lösung B: 1% Azur II (Mallory's Azur)

→ Lösung A und B bei Bedarf 1:1 mischen und filtrieren

Sulfitwasser:

1 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_3$

+ 10 ml 1 M HCl

+ 100 ml H_2O

Puffer A1 (für magnetische Beads): 19 ml 1 M NaH_2PO_4

81 ml 1 M Na_2HPO_4

→ auf 1 l mit H₂O auffüllen, pH 8,0 einstellen

Blockierungslösung für Beads: 5 mg BSA in 1 ml Puffer A1

Kollagenase A-Verdaulösung: 1 mg Kollagenase A in 1 ml HBSS

Verdünnungslösung: 0,01 M Natriumphosphatpuffer

(für Kaninchen IgG) 0,025 M NaCl

→ auf pH 7,6 einstellen

Kaninchen IgG (11 mg/ml): mit Verdünnungspuffer auf 2 mg/ml einstellen

Ketamin/Xylazin: Ketamin 10% und Xylazin 2% im Verhältnis 2:1 mischen

Homogenisierungslösung: 3% Triton X-100

(GBM-Antiserum) 20 mM EDTA

1 mM Benzamidin

5 mM NaN₃

→ in 1x PBS

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

A. Lagerung und Kultivierung von Bakterien

Arbeiten mit Bakterien (*E. coli*) wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Lagerung der Bakterien geschah bei -80°C in einer Glyzerin-Kultur (=Stammkultur). Hierbei wurden 300 μl Glyzerin (100%) und 600 μl einer bakteriellen Über-Nacht-Kultur eingefroren. Bei einer gewünschten Anzucht von Bakterien wurde ein entsprechender Abstrich der Stammkultur in LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika überführt und bei 37°C unter ständigem Schütteln (250 rpm) ü.N. inkubiert. Das angeimpfte Kulturmedium enthielt, je nach verwendetem Plasmid, folgende entsprechende Antibiotika-Konzentrationen:

Ampicillin: 500 $\mu\text{g/ml}$

Tetracyclin: 12 $\mu\text{g/ml}$

Kanamycin: 30 $\mu\text{g/ml}$

Hatten die Bakterien die gewünschte Dichte erreicht, wurden diese für die darauffolgende DNA-Präparation verwendet.

B. Messung der optischen Dichte bei Bakterienkulturen

Für die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Bakterienkultur wurde 1 ml der Kultur entnommen und mittels einer Plastikkuvette bei einer OD von 595 nm im Spektralphotometer „U-2000“ vermessen. Als Nullwert diente steriles LB-Medium. Wurde eine optische Dichte von $\geq 1,0$ erreicht, erntete man daraufhin die Bakterien zur DNA-Präparation und weiteren Verwendung (s.a. 2.2.1 C).

C. Plasmid-DNA-Maxipräparation aus *E. coli*

Für die Plasmid-DNA-Maxipräparation wurde entsprechend dem Protokoll des „CompactPrep Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen verfahren.

Zur Plasmid-Isolierung wurden 100 ml einer ü.N.-Kultur von *E. coli* für 15 min bei 4.000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Multifuge 3 L-R mit Rotor 2454). Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 5 ml Resuspensionspuffer P1 (mit RNase A) vollständig resuspendiert. Anschließend gab man 5 ml Lysepuffer P2 hinzu, kippte 5x das Gefäß vorsichtig und inkubierte die Lösung für weitere 3 min bei RT; in der Zwischenzeit wurde die Filterabsauganlage mit Absaugsäulen vorbereitet. Nach Zugabe des Neutralisationspuffers S3 und anschließendem mehrmaligen Kippen wurde die Lösung in Filtereinheiten gegeben, dort für 3 min inkubiert und dann langsam mittels eines Stempels hindurchgedrückt. Nach Zugabe von 5 ml Puffer BB zum Filtrat und fünfmaligen Kippen des Gemisches wurde die Mischung in die vorbereiteten Absaugsäulen überführt. Durch Aufdrehen der angeschlossenen Wasserstrahlpumpe wurde nun die Lösung langsam durch die Säule gesogen; anschließend wurde das Vakuum aufgehoben. Um nachfolgend die DNA zu waschen, wurden die Filtersäulchen in neue 2 ml Reaktionsgefäße gesteckt, 0,7 ml Waschpuffer PE hinzu pipettiert und für 1 min bei 12.000 rpm in einer Minizentrifuge zentrifugiert. Nach Entfernen des Durchlaufs wurde ein weiteres Mal für 1 min bei 12.000 rpm zur Trocknung der Säule zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren, wurde das Säulchen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 100 µl H₂O zugegeben und für 1 min inkubiert. Anschließend wurde abermals für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die erhaltene DNA konnte nun auf ihre Quantität (Konzentrationsbestimmung s.a. 2.2.2) und Qualität (Agarosegel s.a. 2.2.3) überprüft werden.

2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Messung der DNA-Konzentration wurde eine 1:20 Verdünnung der DNA-Lösung in H₂O durchgeführt, in eine Quarzküvette überführt und in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen; als Referenzwert diente reines H₂O. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 0,05 µg/µl. Die Konzentration der DNA-Lösung konnte somit nach folgender Formel berechnet werden:

$$c[\text{DNA}] = \text{OD}_{260} \times 20 \times 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Ebenso wurde eine Messung einer 1:20 Verdünnung bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt, um die Reinheit der Probe bestimmen zu können. Dies ergibt sich aus dem Quotienten von $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, der im besten Fall zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte und abweichend dann eine eventuelle Verunreinigung durch Proteine anzeigt.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Mittels der DNA-Gelelektrophorese wird die DNA im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Größe in einer Agarosematrix aufgetrennt. Durch eine geschickte Wahl der Agarosekonzentration (meist wurde ein 1% iges Gel verwendet), kann der Größenbereich der Auftrennung variiert und so ein deutlicheres Ergebnis erzielt werden.

Für das jeweilige Gel wurde die entsprechende Menge an Agarose abgewogen und mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt. Während die Menge für ein Minigel 25 ml betrug, wurden bei einem Midigel 125 ml benötigt. Die Mischung wurde in einer Mikrowelle oder auf einer Heizplatte so lange erhitzt, bis sie zu kochen begann und die Agarose vollständig im Puffer gelöst war. Nach etwa handwarmer Abkühlung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben und das flüssige Gel in die Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer so weit befüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Die mit 5x Probenpuffer versetzten Proben konnten nun zusammen mit dem DNA-Standard aufgetragen werden. Die Agarosegele wurden mit bis zu 150 V gefahren und anschließend auf einem UV-Tisch abfotografiert und analysiert.

2.2.4 Arbeiten mit Säugerzelllinien

A. Kultivierung von Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zelllinien benutzt, die entweder als stabil trans-fizierte Zelllinie oder als primäre Zelllinie verwendet wurden. Bei allen Arbeiten wurde unter sterilen Bedingungen mit autoklavierten Material oder sterilen Einwegartikeln in einer Zellkul-

turarbeitsbank gearbeitet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen oder -schalen in einem Inkubator mit 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre. Je nach Zelllinie wurden verschiedene Medien und Zusätze verwendet, die in Tabelle 5 übersichtlich dargestellt sind:

Zelllinie	Kulturmedium	Zusätze	Besonderheiten
HtTA-1	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Doxyzyklin	stabil transfizierte Zelllinie
HtTA-1/myc-LMX1B	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Doxyzyklin 300 µg/ml Hygromycin	stabil transfizierte Zelllinie
LtTA-2	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Doxyzyklin	stabil transfizierte Zelllinie
LtTA-2/myc-LMX1B	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Doxyzyklin 300 µg/ml Hygromycin	stabil transfizierte Zelllinie
Glomeruli-/Podozyten-Zelllinie	DMEM	10% FCS	primäre Zellen
Makrophagen	RPMI	10% FCS 1x Penicillin/Streptomycin	primäre Zellen
MEFs	DMEM	10% FCS 1x Penicillin/Streptomycin	primäre Zellen
9E10	RPMI	10% FCS	Hybridom

Tab. 5: Verwendete Medien mit ihren jeweiligen Zusätzen

Passagieren von Zellen

Im Falle von stabil transfizierten Zelllinien wurden diese nach Erreichen einer 80-90% igen Konfluenz auf mehrere Zellkulturflaschen bzw. -schalen aufgeteilt („passagiert“), um so ausreichend Material für zellbiologische Experimente zur Verfügung zu haben. Hierfür wurden die adhärenenten Zellen zunächst mikroskopisch überprüft, um eventuelle Veränderungen der Zellen feststellen zu können. Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen das Medium mit einer

Pipette abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und daraufhin mit Trypsin-EDTA für 3-5 min inkubiert, um die Zellen abzulösen. Die Ablösung konnte durch leichtes Klopfen auf den Rand der Kulturflasche oder -schale beschleunigt werden. Um die Wirkung des Trypsin zu beenden, wurde ausreichend, d.h. mindestens die dreifache Menge, FCS-haltiges Medium auf die abgelösten Zellen gegeben. Die Zellen wurden durch Auf- und Absaugen mit einer Pipette vereinzelt. Nun konnten die Zellen auf neue Kulturflaschen oder -schalen in der gewünschten Dichte aufgeteilt werden, Flaschen bzw. Schalen wurden wieder mit dem jeweiligen Medium befüllt.

Bei primären Zellen wurde auf ein mehrmaliges Passagieren verzichtet, da sich dadurch eine zu heterogene Zellpopulation durch Zellveränderungen ergeben würde. Diese Zellen wurden maximal einmal zur Vermehrung der verfügbaren Zellen gesplittet.

Zellzahl bestimmen

Um Zellen in der gewünschten Dichte aussäen zu können, wurden abgelöste Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen konnten durch die Färbung mit Trypanblau detektiert werden. Je nach Versuchsansatz wurden bis zu 100% konfluente Bedingungen gewählt, was beim jeweiligen Versuch näher beschrieben wird.

Auftauen und Einfrieren von Zellen

Um Zellen für Versuchsansätze zur Verfügung stellen zu können, mussten Stammkulturen der Zellen angelegt werden, die aus vorhergehenden Arbeiten entstanden sind. Um nun Kulturen einer Zelllinie für Analysen anlegen zu können, wurde ein Kryoröhrchen aus einem -196°C Tank mit flüssigem Stickstoff entnommen, der zur Lagerung der Kulturen diente. Nachdem die Zellsuspension aufgetaut war, wurde sie sofort in 10 ml FCS-haltigem Medium aufgenommen und für 5 min bei 750 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in 5 ml des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen und in T25 Kulturflaschen überführt; diese wurden dann wie bereits oben beschrieben kultiviert und bei ausreichender Dichte passagiert.

Musste man Zellen für spätere Analysen konservieren, wurde zunächst eine entsprechende Menge an Zellen in Kulturflaschen bis zur annähernden Konfluenz gezogen und mittels Trypsin-EDTA abgelöst (s.o.). Nach einem Waschschrift mit FCS-haltigem Medium und anschließendem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in der gewünschten Menge an 90% FCS/10% DMSO aufgenommen und jeweils 1,8 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden sofort bei

-80°C eingefroren und nach einigen Tagen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

B. Ernte von Zellen

Sollen adhärente Zellen für spätere RNA-Präparationen oder Proteinlysate geerntet, zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht weiter behandelt werden, werden diese zunächst zweimal mit 1x PBS gewaschen. Folgend wurden die Zellen entweder mittels eines Zellschabers und 1 ml 1x PBS abgeschabt oder mittels Trypsin abgelöst und in FCS-haltigem Medium aufgenommen. Zellen wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 900 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde darauffolgend mit 5 ml 1x PBS gewaschen und nach Absaugen des Überstandes in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Pellet bei -80°C eingefroren.

C. Induktion der Proteinsynthese

Bei der stabil transfizierten Zelllinie HtTA-1/myc-LMX1B wurde durch die Zugabe von Doxzyklin die Expression von LMX1B unterdrückt. Hierfür wurde das von Gossen & Bujard 1992 entwickelte transkriptionelle Regulationssystem „tet-off“ verwendet, welches auf Elementen des Tetrazyklin-Resistenz-Operons von *E. coli* beruht. Hierbei wurde der Tetrazyklin-Repressor (tetR) von Tn10 mit der C-terminalen Aktivierungsdomäne des VP16 aus dem Herpes Simplex Virus fusioniert, wodurch ein Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator (tTA) entstand. Dieser Transaktivator wird durch ein in die Zielzellen transfiziertes Plasmid konstitutiv produziert. In einem weiteren Plasmid wurde die Ziel-cDNA unter der Kontrolle eines CMV-Minimalpromotors kloniert, die auch die Operator-Sequenz aus *E. coli* (tetO) enthält. Durch Zugabe von Tetrazyklin wird eine Bindung des Transaktivators an das Operon verhindert und inhibiert somit die Transkription. Entfernt man allerdings das Tetrazyklin, kann der Transaktivator an den Operator binden und aktiviert dadurch die Transkription der nachgeschalteten Ziel-cDNA LMX1B (s.a. Abb. 4). In unseren Versuchsreihen wurde anstelle von Tetrazyklin Doxzyklin verwendet, was eine höhere Affinität zum Repressor aufweist und somit in niedrigeren Dosen verwendet werden kann.

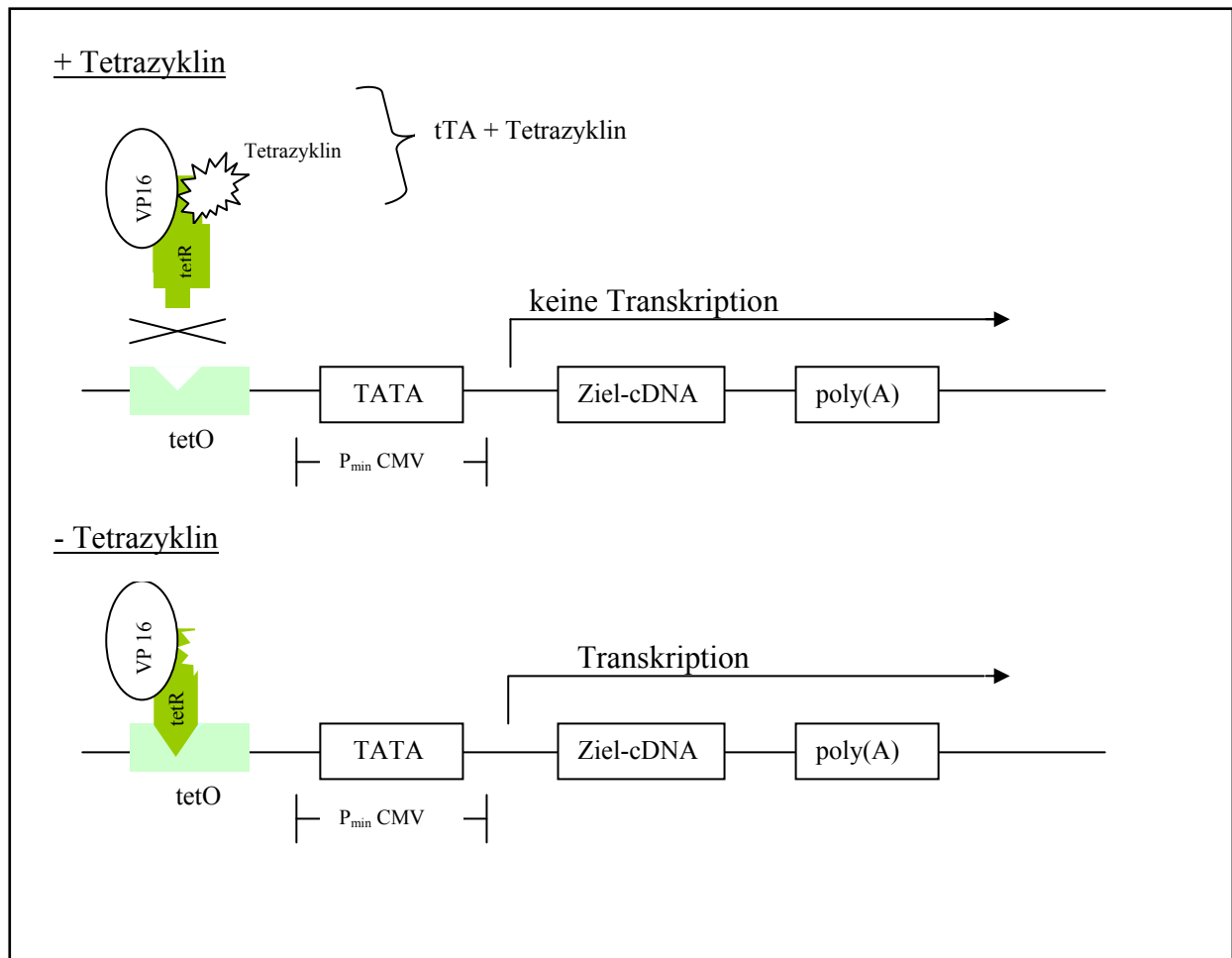


Abb. 4: Funktionsweise des „tet-off“-Systems: VP16: virales Protein 16 des Herpes Simplex Virus; tetO: Tetrazyklin-Operator; tetR: Tetrazyklin-Repressor; TATA: TATA-Box; P_{min}CMV: Minimalpromotor des CMV; poly(A): Polyadenylierungssignal; tTA: Fusionsprotein zwischen tetR und VP16 [Kastner, 2004].

Um in verschiedenen Ansätzen die Synthese von LMX1B zu induzieren, wurde zunächst von den Zellen das Medium abgenommen, dann zweimal mit 1x PBS gewaschen und frisches Medium ohne Doxyzyklin zugegeben. Parallel hierzu wurden Kontrollzellen weiterhin mit Doxyzyklin inkubiert, um die Expression von LMX1B zu verhindern und somit Vergleichswerte einer Zellpassage zu erhalten. Wurden Zeitkurven der Expression aufgenommen, entsprach der Tag der Induktion des Proteins dem Tag 0.

D. Herstellung von Ganzzelllysaten

Um Zellen für spätere Analysen zu gewinnen, wurden diese zunächst entsprechend der gewünschten Bedingungen in Medium mit (keine Expression) und ohne Doxyzyklin (Expression von LMX1B) kultiviert. Daraufhin wurde von den Zellen das Medium entfernt, diese zweimal

mit 1x PBS gewaschen und anschließend entweder mittels Trypsin abgelöst oder mit einem Zellschaber und 1 ml 1x PBS abgeschabt. In beiden Fällen wurden die Zellen nach dem Ablösen in Medium aufgenommen (bei der Trypsin-Methode mit FCS, um die Reaktion zu stoppen) und bei 4° mit 2.500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen nochmals in 5 ml 1x PBS gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde der Überstand abermals abgesaugt und das Zellpellet, je nach Größe, in 50 bis 200 µl Brij®-Lysepuffer gelöst; anschließend wurde das Zelllysate für 30 min bei 4°C inkubiert. Das Lysat wurde daraufhin für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand, in dem sich nun das Proteinlysate befand, abgenommen. Jetzt konnte das Lysat sofort weiter benutzt oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren werden.

E. Herstellung von Kern- und Cytoplasmalysaten

Da LMX1B ein nukleäres Protein ist und bei Ganzzelleextrakten der Einfluss von cytosolischen Proteinen gravierend sein kann, wurden von Zellen ebenfalls Kern- und Cytoplasmalysate gefertigt. Hierfür wurde zunächst von den gewünschten Zellkulturen das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und daraufhin mittels eines Zellschabers und 1 ml 1x PBS abgelöst. Die Zellen wurden mit einer Pipette in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde nochmals mit 1 ml 1x PBS nachgewaschen und Reste ebenfalls in das Reaktionsgefäß übertragen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1.200 rpm wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 500 bis 750 µl Zelllysepuffer A aufgenommen. Anschließend wurde dies für 5 min auf Eis inkubiert und für weitere 5 min bei 4°C und 4.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt; dies stellte das cytosolische Lysat dar und konnte nun bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren werden.

Das verbleibende Pellet wurde in 100-150 µl Kernlysepuffer B resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden 5 minütigen Zentrifugation bei 4°C und 14.000 rpm konnte der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden, was nun den Kernextrakt enthielt. Auch hier wurde das Lysat bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

F. Präparation von globulären bzw. fibrillären Aktin

Adhärente Zellen wurden zunächst zweimal kurz mit 1x PBS gewaschen. Dann wurden diese mit 1 ml 1x PBS überdeckt und mit einem Zellschaber abgekratzt, anschließend für 5 min bei 100 g und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstandes wurde das Pellet in 500 µl eiskaltem Lysepuffer G für 5 min inkubiert und wiederum für 10 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt: diese Fraktion beinhaltet das globuläre Aktin. Das Pellet wurde nochmals in 500 µl Lysepuffer G gewaschen und daraufhin in 100 µl Lysepuffer F resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min folgte eine weitere Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde abermals abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt: diese Fraktion beinhaltet das fibrilläre Aktin.

2.2.5 Scratch-Assay

Beim sog. „Scratch-Assay“ werden Zellen, die zuvor auf einer Oberfläche konfluent gewachsen waren, teilweise abgekratzt. Daraufhin versuchen die Zellen die Lücke wieder zu schließen und wandern in die Lücke ein. Hierbei sind sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Kontakte von besonderer Bedeutung. Somit lassen sich etwaige Unterschiede in der Regulation dieser Kontakte bei einer Messung der Zellmigration feststellen.

Zunächst wurden Zellen mit und ohne Induktion der LMX1B-Expression für 3 Tage in Kulturfラスchen kultiviert. Daraufhin wurden diese trypsiniert, gezählt und in der jeweiligen Dichte (2×10^6 Zellen/ml) in P6-Kulturschalen ausgesät, so dass am nächsten Tag eine Konfluenz von 100% erreicht wurde. Vor Versuchsbeginn wurden diese Zellen unter dem Mikroskop nochmals kontrolliert. Anschließend wurde mit einem Spatel ein 4 mm breiter Strich über den Boden der Kulturschale gezogen, so dass hier die Zellen abgeschabt wurden. Folgend wurde zweimal mit Medium gewaschen, um abgelöste Zellen aus dem Medium zu entfernen. Von diesen freien Stellen wurden nun täglich Aufnahmen gefertigt, so dass die Geschwindigkeit, mit der die freie Stelle wieder mit Zellen bewachsen wurde, festgestellt werden konnte. Aus diesen Aufnahmen wurde ein Zeitverlauf über 3 - 4 Tage erstellt.

2.2.6 Zell-Motilitäts-Test

Bei diesem Test wurde die Motilität von LMX1B-exprimierenden und nicht-exprimierenden HeLa-Zellen verglichen. Hierfür wurde in den Zellen zunächst für 3 Tage eine LMX1B-Expression induziert bzw. verhindert. Diese Zellen wurden daraufhin mit Trypsin abgelöst und jeweils 1×10^4 Zellen in den inneren Bereich einer optischen Petrischale der Firma „ibidi“ ausgesät. Nach Auffüllen mit dem jeweiligen Medium wurden die Zellen für einen weiteren Tag im Inkubator bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und gegen ein Hepes-gepuffertes Medium ersetzt, so dass eine fehlende CO₂-Atmosphäre außerhalb des Inkubators kompensiert werden konnte. Die optischen Schalen mit den Zellen wurden nun in das Mikroskop „Axiovert 200M“ eingelegt, welches von einer 37°C Kammer umgeben war. Somit konnten optimale Bedingungen für die Zellen bei den darauffolgenden Analysen geschaffen werden. Von nun an wurde über einen Zeitraum von 8 h jede Minute ein Bild der Zellen aufgenommen, wobei diese Bilderreihe später zu einem Film zusammengesetzt werden konnte (MetaMorph 6.1). Mittels des Programms „ImageJ“ wurde nun der zurückgelegte Weg der Zellen gemessen und ausgewertet.

2.2.7 Auszählung von angehefteten Zellen

Zellen können mittels Integrinen an RGD-Sequenzen (Arginin, Glycin, Asparaginsäure) von Proteinen der extrazellulären Matrix binden. Dadurch werden fokale Adhäsionskomplexe gebildet oder diverse Zellsignale weitergeleitet. Durch die Verwendung von zyklischem RGD kann diese Verbindung gestört und ein Anheften an die Oberfläche beeinträchtigt werden.

In unseren Versuchen wurden zunächst Zellen für 3 Tage mit und ohne Doxyzyklin kultiviert, um eine Induktion von LMX1B zu vermeiden bzw. zu ermöglichen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen trypsiniert, ausgezählt, 1×10^4 Zellen in Hepes-gepuffertem Medium aufgenommen und in optische Kulturschalen von „ibidi“ überführt. Zusätzlich wurden bei verschiedenen Versuchsansätzen unterschiedliche Konzentrationen an zyklischem RGD (100 nM, 1 µM, oder 10 µM) zugegeben, um einen möglichen Effekt der beeinträchtigten Adhäsion genauer verdeutlichen zu können. Das Medium wurde insgesamt auf 500 µl aufgefüllt. Diese Kulturschalen wurden nun in einer 37°C Kammer im Mikroskop betrachtet, wobei im Zeitraum von einer Stunde jede Minute eine Aufnahme von den Zellen gemacht wurde (Programm „MetaMorph“). Diese

Aufnahmen ergaben aneinandergereiht eine Filmsequenz („ImageJ“), in der man feststellen konnte, wie schnell die Zellen an ihre Oberfläche anhafteten und Ausläufer bildeten. Nach jeweils einer Stunde Laufzeit wurden die angehefteten Zellen pro Gesichtsfeld ausgezählt und in Verhältnis zu der Gesamtzahl an Zellen im Gesichtsfeld genommen. Dies wurde graphisch dargestellt.

2.2.8 Arbeiten mit Proteinen

A. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen wurde nach der Bradford-Methode vorgegangen. Bei dieser colorimetrischen Bestimmung wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 von 450 nm nach 595 nm gemessen, was durch die Komplexbildung des Farbstoffs mit Proteinen geschieht. Da die Bildung der Proteinkomplexe und somit eine Verschiebung der Absorption direkt proportional zur Proteinkonzentration ist, kann über eine Eichkurve die direkte Proteinkonzentration abgelesen werden.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine Eichkurve mit den BSA-Konzentrationen 0,1, 0,25, 0,5, 1,5 und 5 µg BSA/µl in 1 ml Coomassie-Lösung erstellt. Zur Kalibrierung des Spektralphotometers wurde H₂O verwendet. Bei der eigentlichen Messung der Proteinkonzentration wurden nun 5 µl der zu messenden Probe mit 1 ml Coomassie-Lösung vermischt und für 5 min inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Absorption der Proben bei 450 bzw. 590 nm gemessen. Mit den BSA-Standards wurde ebenso verfahren. Aus den Werten der Standard-Proben wurde der Mittelwert des Quotienten aus 450 und 590 nm gebildet, wobei mit Hilfe dieses korrigierten Quotienten die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben berechnet werden konnte.

B. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Dabei müssen die Proteine durch ein Gel-Maschenwerk laufen und werden je nach ihrer Größe voneinander separiert.

Das verwendete Gelsystem bestand aus einem unteren Trenngel, welches die Proteine entsprechend ihrer Größe auftrennte, und einem Sammelgel, welches die aufgetragenen Proben sammeln und somit einen gleichzeitigen Start ermöglichen sollte. Das Trenngel wurde entsprechend der gewünschten Auftrennkapazität verschieden prozentig gewählt, die Standardgröße betrug 10%. Nach Gießen des Trenngels zwischen den Glasplatten wurde es mit 2 ml H₂O übergossen, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. War das Trenngel polymerisiert, wurde das Wasser abgenommen, das Sammelgel darüber gegossen und dieses mit einem Gelkamm mit Taschen versehen. Nachdem auch dieses Gel auspolymerisiert war, konnte der Gelkamm entfernt werden, das Gel mit den Glasplatten in die Gelkammer überführt und diese mit Laufpuffer befüllt werden. In die Taschen wurden nun die Proben aufgetragen, die zuvor mit einem entsprechenden Volumen SDS-Probenpuffer vermischt und für 5 min gekocht wurden. Nach dem Auftragen wurde die Kammer verschlossen und eine Spannung von 500 V angelegt, um die Proteinlysate durch die Gelmatrix laufen zu lassen. Die Auftrennung war beendet, nachdem das Bromphenolblau des Probenpuffers am unteren Ende angelangt war. Die Gele wurden entnommen und das Trenngel vom Sammelgel getrennt; das Trenngel wurde nun für eine Coomassie-Färbung (s.a. 2.2.8 C) oder Western Blot (s.a. 2.2.8 D) weiter verwendet.

C. Coomassie-Färbung

Wollte man nur eine Verteilung oder Quantität der Proteine aus der Probe feststellen, reichte es aus, wenn man ein SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie färbte. Hierzu wurde das Trenngel zunächst für 1 h bei RT mit Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert, so dass Proteine im Gel ausreichend gefärbt wurden. Danach wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt. Diese wurde mehrmals gewechselt, bis eine ausreichende Signalschärfe durch Entfärbung des Hintergrundes gegeben war. Das nun gefärbte Gel wurde in Klarsichtfolie eingewickelt und dokumentiert.

D. Western Blotting

Sollten Proteine anhand einer Immundetektion sichtbar gemacht werden, mussten die zuvor bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße) übertragen werden. Hierfür wurde das Tank-Blot-Verfahren verwendet, bei dem das Trenngel und die

Membran in einer Trägerapparatur eingespannt werden und die Proteine im elektrischen Feld vom Gel auf die Membran übertragen werden. Diese Trägerapparatur setzt sich aus mehreren Schichten zusammen, die wie folgt angeordnet sind: ein Schaumstoffpolster, drei Lagen Whatman-Papier, die PVDF-Membran, das Trenngel, drei Lagen Whatman-Papier und ein Schaumstoffpolster. Der Träger wurde so in die Western Blot Kammer positioniert, dass bei Anlegen des elektrischen Feldes die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert werden. Vor dem Zusammenbauen der einzelnen Schichten wurde die PVDF-Membran für 5 min mit Methanol benetzt und anschließend in Transferpuffer geschwenkt. Die Schaumstoffpolster, die Whatman-Papiere und das Gel wurden ebenso in Transferpuffer äquilibriert. Nach Einbringen der präparierten Trägerapparatur in die Western Blot Kammer und Befüllen mit Transferpuffer wurde diese verschlossen, eine Kühlschleife angelegt und der Transfer für 2,5 h bei 1 A durchgeführt.

Nach Beendigung des Transfers wurden mittels eines Markers die Banden des Standard-Proteinmarkers auf die Membran eingezeichnet und die Membran sofort in Blockierungslösung überführt. Hier wurde sie für mindestens 1 h geschwenkt, bei Bedarf wurde die Membran auch über Nacht bei 4 °C blockiert.

E. Färbung mit Antikörpern

Um freie Bindungsstellen auf der PVDF-Membran zu blockieren, wurde diese zunächst für 1 h bei RT bzw. ü.N. bei 4°C in Blockierungslösung geschwenkt. Danach wurde die Blockierungslösung durch frische ersetzt, welche mit dem ersten Antikörper zur Bindung an das Protein versetzt war. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation unter langsamen Schwenken wurde die Antikörperlösung abgenommen und daraufhin die Membran 4x für 10 min mit Waschlösung gewaschen. Danach wurde die Waschlösung entfernt und frische Blockierungslösung mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper für eine Stunde auf die Membran gegeben. Anschließend wurde abermals 4x für 10 min mit Waschlösung gewaschen, ein letzter Waschgang mit H₂O für 5 min folgte. Um nun ein Signal detektieren zu können, wurde eine 1:1 Mischung des „Western Lightning Chemoluminescence Reagent“ von Perkin Elmer auf die Membran aufgebracht und für 5 min inkubiert. Die Membran wurde daraufhin in Klarsichtfolie eingewickelt, in eine Filmkassette überführt und in der Dunkelkammer des Fotolabors mit einem Röntgenfilm bedeckt. Nach verschiedenen langen Expositionszeiten des Films auf der Membran (10 sek – ü.N.) wurden die Röntgenfilme mittels Entwickler und Fixierer entwickelt und die Sig-

nale sichtbar gemacht. Um letzte Chemikalien abzuwaschen, wurde der Film noch für 15 min gewässert und anschließend zum Trocknen aufgehängt; eine Analyse und Dokumentation war nun möglich.

2.2.9 Arbeiten mit RNA

A. Gewinnung von RNA

Um RNA aus Zellen gewinnen zu können, wurde entsprechend dem Protokoll des „NucleoSpin® RNA II“ von Macherey-Nagel vorgegangen. Hierfür wurden adhärente Zellen einer P6-Kulturschale entweder direkt aus der Schale oder nach Ernte der Zellen (gemäß 2.2.4 C) zur RNA-Präparation benutzt.

Gemäß dem Protokoll wurden die Zellen entweder noch adhärent auf der Gewebekulturschale oder als gefrorenes Zellpellet mit 350 µl Lysepuffer (mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol) lysiert. Anschließend wurde das Lysat durch eine Filtereinheit bei 11.000 g für 1 min zentrifugiert und mit weiteren 350 µl 70% Ethanol zur Bindung an eine Membran vorbereitet. Die Bindung der RNA an die Quarzsäule geschah durch eine 30sekündige Zentrifugation bei 11.000 g. Nach der Entsalzung der Säule mit 350 µl MDB und einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 11.000 g für 1 min wurde 95 µl DNase für 15 min auf die Säule gegeben, um etwaige DNA zu verdauen. Nach drei weiteren Waschschritten mit Waschpuffer RA2 bzw. RA3 wurde die Säule in ein RNase-freies Zentrifugiergefäß überführt und 60 µl RNase-freies H₂O auf die Säule gegeben. Nach einer Zentrifugation bei 11.000 g für 1 min wurde der Durchfluss nochmals auf die Säule gegeben und die Zentrifugation wiederholt, um die Ausbeute an RNA zu erhöhen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

B. Bestimmung der Konzentration von RNA

Zur Bestimmung der Konzentration der RNA-Lösung wurde diese 1:25 in H₂O verdünnt und im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette vermessen. Als Nullwert diente reines H₂O. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine Absorption von 1 einer

RNA-Konzentration von 0,04 µg/µl. Nach folgender Formel konnte die RNA-Konzentration berechnet werden:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 25 \times \text{OD}_{260\text{nm}} \times 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

C. Kontrolle der Qualität der RNA

War die Konzentration der RNA bekannt, wurden nun 200 ng RNA auf ein 1% iges Agarosegel aufgetragen, um anhand der Schärfe der 18S und 28S rRNA Banden die Qualität der RNA feststellen zu können. Die Agarosegelelektrophorese wurde wie unter 2.2.3 durchgeführt, allerdings wurden in diesem Fall die Apparatur und alle zugehörigen Teile zuvor mit RNase-Dekontaminationsspray behandelt, um einen RNA-Abbau zu verhindern. Nach dem Befüllen der Mini-Agarosegelapparatur mit 1x TAE wurden die RNA-Proben, versetzt mit 6x RNA-Probenpuffer, in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V. Anschließend wurde das Gel unter dem UV-Schirm abfotografiert und die Schärfe der beiden Banden überprüft.

D. cDNA Synthese

Die isolierte RNA wurde mittels des iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 1 µg RNA mit 15 µl RNase-freiem H₂O vermischt, dann 4 µl 5x iScript Reaktionsmix [Gemisch aus Oligo(dT)-Primern und Zufalls-Hexameren] und schließlich 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben. Diese Mischung wurde nun im Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert:

- | | | |
|-----|--------|------|
| 1.) | 5 min | 25°C |
| 2.) | 30 min | 42°C |
| 3.) | 5 min | 85°C |
| 4.) | ∞ | 4°C |

Die fertige cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

Als Kontrolle wurde bei jedem cDNA Ansatz auch eine –RT-Probe mitgeführt, bei der die Reverse Transkriptase fehlte und durch H₂O ersetzt wurde. Dadurch konnte bei späteren Analysen eine Verunreinigung der cDNA-Probe mit chromosomaler DNA nachgewiesen werden.

E. Echtzeit-PCR

Bei der Echtzeit-PCR handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung der Menge an mRNA eines bestimmten Gens. So kann man die Expression des untersuchten Gens ins Verhältnis zu einem Referenzgen setzen und somit Aussagen über die Höhe der Genexpression zu diesem Zeitpunkt machen.

Für diese Analysen wurde zunächst die RNA aus den jeweiligen Proben (Zellen oder Gewebe) gewonnen (s.a. 2.2.9 A) und in cDNA umgeschrieben (s.a. 2.2.9 D). Diese cDNA dient nun als Matrize für die darauffolgende Polymerasekettenreaktion (PCR), bei welcher ein fluoreszierender Farbstoff, SYBR Green, zugegeben wird, der Fluoreszenz emittiert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden hat, nicht aber wenn er sich im ungebundenen Zustand befindet [Bustin, 2000]. Mit jedem PCR-Zyklus wird das Amplifikat verdoppelt und somit auch das Fluoreszenzsignal. Übersteigt das spezifische Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant, wird hier der Schwellenwert gesetzt, welcher nun als CT-Wert („cycle-threshold“) festgelegt wird. Dieser wird so gewählt, dass er am Anfang der exponentiellen Phase auftritt und somit proportional zu der in der Probe enthaltenen Kopienzahl der untersuchten mRNA ist [Gibson et al., 1996]. Die Expressionsrate des Zielgens konnte nun im Verhältnis auf ein nicht reguliertes Haushaltsgen bezogen werden, womit eine relative Quantifizierung der Expression des Zielgens möglich wurde; dies wird auch als eine Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet [Heid et al., 1996].

Durchführung

Da es sich bei der Echtzeit-PCR um eine besonders sensitive Methode handelt, musste äußerste Sorgfalt bei der Handhabung der Proben gegeben sein. Von Grund auf wurden sowohl ein gesonderter Arbeitsplatz als auch spezielle Pipetten verwendet, um Kontaminationen durch RNasen zu vermeiden. Der Arbeitsplatz für die RNA-Präparation und Bereitung der Ansätze wurde vor Versuchsbeginn nochmals mit Anti-RNase Spray gereinigt, es wurden Pipettenspitzen mit Filter und frisch autoklavierte Verbrauchsgüter verwendet.

Um einen einheitlichen Versuchsansatz zu erreichen und etwaige Ungenauigkeiten aufgrund der kleinen Volumina auszugleichen, wurden Großansätze gemischt, die dann auf die einzelnen Proben verteilt wurden. Für jeden Ansatz wurde ebenso ein Duplikat mit eingeplant, wodurch die Genauigkeit der Ergebnisse noch erhöht werden konnte. Für einen einzelnen Ansatz wurden folgende Reagenzien und Volumina verwendet und als 2x Mastermix verwendet:

	Volumen	Endkonzentration
10x Taq Pol Puffer	2 µl	1x
25 mM MgCl₂	0,8 µl	2,5 mM
25 mM dNTP's	0,16 µl	0,2 mM
H₂O	6,71 µl	
gesamt	9,67 µl	

Tab. 6: Zusammensetzung des 2x Mastermix für die Echtzeit-PCR

Ebenso wurden folgende Reagenzien unmittelbar vor dem Versuch zusammen pipettiert und nachfolgend dem 2x Mastermix zugegeben; dies wurde fortan als 2x Stammlösung verwendet.

	Volumen	Endkonzentration
2x Mastermix	9,67 µl	1x
5 U/µl Hotstart-Taq-DNA-Polymerase	0,08 µl	0,4 U/Reaktion
1:500.000 SYBR-Green	0,25 µl	1:40.000.000

Tab. 7: Zusammensetzung der 2x Stammlösung

Als nächstes wurde für jede zu untersuchende cDNA-Probe eine Mischung aus Stammlösung, H₂O und cDNA gegeben, so dass ein Endvolumen von 15 µl pro Ansatz vorzufinden war.

	Volumen	Endkonzentration
2x Stammlösung	10 µl	1x
H₂O	4,8 µl	
1 µg RNA (äquivalent cDNA)	0,2 µl	10 ng/Reaktion

Tab. 8: Reaktionsansatz für Echtzeit-PCR

Nun wurden jeweils 15 µl dieser Mischung auf 0,1 ml- oder 0,2 ml-Reaktionsgefäße verteilt (auf Eis) und anschließend mit 5 µl eines Primermixes aus 1,6 µM Vorwärts-Primer und 1,6 µM

Rückwärts-Primer aufgefüllt. Die Gefäße wurden verschlossen, in den Rotor des Echtzeit-Thermocycler überführt und folgendes PCR-Programm gestartet:

	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit	Fluoreszenzmessung
Aktivierung der Hotstart-Taq-DNA-Polymerase	1	95°C	15 min	Nein
Amplifikation	40	95°C 60°C	15 sek 1 min	Nein Ja
Schmelzkurve	1	60-95°C (0,5°C-Schritte)	je 5 sek	Ja

Tab. 9: Einzelne Schritte eines Laufes der Echtzeit-PCR

Auswertung

Auf mögliche Fehlerquellen, wie z.B. keine Fluoreszenzmessung, starke Abweichung der beiden Doppelwerte der Messprobe, Amplifikation in der -RT-Probe oder Wasser wurde besondere Rücksicht genommen und noch vor Auswertung der Ergebnisse erfasst. Ein Signal in der -RT-Probe deutet auf eine Verunreinigung mit chromosomaler DNA in der Probe hin, ein Signal in der Wasser-Probe gibt Hinweise auf die Bildung von Primer-Dimeren oder Kontaminationen der Probe. Die Analysen der ebenfalls gebildeten Schmelzkurven zeigten, ob es sich um für das untersuchte Gen spezifische Amplifikate handelt oder um Verunreinigungen.

Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software von Rotor-Gene. Nach Sichtung des ordnungsgemäßen Laufes wurde im Bereich der exponentiellen Phase der „Cycle-Threshold“ (CT-Wert) gesetzt, wodurch nun für jede Amplifikation ein CT-Wert abgelesen werden konnte. Dieser Wert wurde in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) eingegeben. Der relative Gehalt an mRNA in der Probe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$2^{(CT_{\text{Haushaltsgen}} - CT_{\text{Zielgen}})} \times 10.000$$

Im Falle von Proben aus der Zellkultur wurde als Haushaltsgen S9 verwendet, bei der Untersuchung von Gewebeproben das Haushaltsgen Lam A/C. Weil anzunehmen ist, dass sich in jedem Zyklus die Anzahl der amplifizierten cDNA verdoppelt, wurde in der Formel der optimale Faktor „2“ gewählt. Da die Primer vor ihrem Gebrauch auf ihre Qualität getestet wurden, kann von

einem idealisierten Verdoppelungswert ausgegangen werden. Der Faktor „10.000“ war willkürlich gewählt und sollte nur eine Rechnung mit sehr geringen Zahlen vermeiden.

Von den somit erhaltenen Doppelwerten wurden der Mittelwert und die jeweilige Standardabweichung errechnet und schließlich in einem Diagramm graphisch dargestellt.

2.2.10 Immunzytochemie

Um eine Expression von Genen in Zellen feststellen zu können, wurde der immunzytologische Nachweis angewandt, bei der ein spezifischer Antikörper an das jeweils untersuchte Protein binden kann und wiederum als Andockstelle für einen fluoreszenzmarkierten Antikörper dient. Dieses Signal kann dann in einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Die Zellen wurden zunächst (mit oder ohne Induktion von LMX1B) auf Glasplättchen kultiviert, bis sie die jeweils gewünschte Dichte erreicht hatten. Anschließend wurden die Glasplättchen entnommen und sofort in 4% frischem Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei Raumtemperatur gelegt, um die Zellen zu fixieren. Danach wurden die Plättchen zweimal in 1x PBS gewaschen, um Reste von PFA zu beseitigen, und folgend mit 300 µl Blockierungs-/Permeabilisierungslösung für 1 h bei RT inkubiert. Dann wurden die Plättchen zweimal mit 1x PBS gewaschen und der Primärantikörper verdünnt in 1x PBS/2% BSA für 1 h bei RT zugegeben. Nach mehrmaligem Waschen mit 1x Hochsalz-PBS für je 5 min wurde der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper in neuer 1x PBS/2% BSA-Lösung für ebenfalls 1 h bei RT auf die Plättchen mit den Zellen gegeben und in Dunkelheit inkubiert. Nach weiteren vier Waschschritten mit 1x Hochsalz-PBS für jeweils 5 min (ebenfalls in Dunkelheit) wurden die Zellen mit 40% Glycerin auf einem Objektträger eingedeckelt. Später wurde das Fluoreszenzsignal des untersuchten Proteins mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Leica) betrachtet und mit einer Digitalkamera abfotografiert.

2.2.11 Immunhistochemie

Wie bei Zellen kann auch von Geweben die Lokalisation und Stärke der Expression von Proteinen mittels eines fluoreszenzgekoppelten Antikörpers nachgewiesen werden. Hierzu wurden

zunächst 7 µm dicke Paraffinschnitte von Nieren gefertigt und diese nach folgendem Protokoll entparaffiniert:

1. 2x 10 min in Xylol
2. 2x 1 min in 100% Isopropanol
3. 2x 1 min in 96% Isopropanol
4. 1x 1 min in 80% Isopropanol
5. 1x 1 min in 70% Isopropanol
6. 1x 2 min in H₂O
7. 1x 30 min in 1x PBS

Anschließend wurden die auf den Objektträgern fixierten Schnitte entweder mit oder ohne Mikrowellenbehandlung präpariert. Hierfür wurden die Schnitte senkrecht in verschließbare Plastikboxen mit 10 mM Natriumzitrat gestellt und in einer Mikrowelle für 5 min bei 800 W inkubiert. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt, wobei nach jedem Schritt das verlorene Natriumzitrat aufgefüllt wurde, so dass die Schnitte niemals trocken wurden. Nach dem letzten Schritt wurden die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt und für weitere 5 min in 1x PBS überführt. Nach Entnahme der Objektträger wurde mittels eines Fettstifts ein Kreis um das Präparat gezeichnet, um den Gebrauch von Reagenzien zu minimieren. Anschließend wurde eine kombinierte Blockierungs- und Permeabilisierungslösung (2% BSA/0,05% Triton X-100/1x PBS) für 20 min auf die Schnitte gegeben. Nach einmaligem Waschen des Schnittes mit 1x PBS wurde der erste Antikörper, verdünnt in 2% BSA/1x PBS, für eine Stunde auf den Schnitt gegeben; hierbei wurde eine feuchte Kammer verwendet, um eine rasche Verdunstung und somit ein Eintrocknen der Lösung zu vermeiden. Daraufhin wurde der Schnitt 4x 5 min mit 1x Hochsalz-PBS und 1x 5 min mit 1x PBS gewaschen. Die Inkubation des fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpers erfolgte für eine Stunde in einer verdunkelten Feuchtkammer. Nach viermaligem Waschen mit 1x Hochsalz-PBS und einem weiteren Waschschriff mit 1x PBS für jeweils 5 min wurde das Präparat mit 40% Glycerin unter einem Deckglas eingedeckelt. Jetzt konnten die Signale im Fluoreszenzmikroskop analysiert und ausgewertet werden.

2.2.12 TUNEL-Färbungen

Wenn Zellen Apoptose begehen, wird ihr DNA-Strang durch Endonukleasen fragmentiert und es entstehen freie Hydroxygruppen an den Enden dieser Bruchstücke. An diesen freien Enden kön-

nen durch die „Terminale Desoxynukleotidyl Transferase“ fluoreszenzmarkierte Nukleotide angehängt werden, welche im Mikroskop eine sichtbare charakteristische Fluoreszenz emittieren. So kann durch ein positives Signal das Vorhandensein von Apoptose festgestellt werden.

Bei der sog. TUNEL-Färbung („Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling“) wurden zunächst histologische Schnitte von Nieren induzierter bzw. nicht-induzierter Mäuse genommen. Die Mäuse wurden hierbei für 1 Woche mit Doxzyklin behandelt, bis eine frühe und zugleich heftige Proteinurie festzustellen war. Diese Schnitte wurden zunächst entparaffiniert, dann entsprechend dem Protokoll des „In Situ Cell Death Detection“-Kits von Roche behandelt. Hierfür wurden die Schnitte zuerst für 15 min bei RT mit Proteinase K vorbehandelt (20 µg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4). Anschließend wurden diese zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit Blockierungslösung (0,3% H₂O₂) für 10 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS wurden die Nierenschnitte mit 0,1% Triton X-100 in 0,1% Natriumzitat für 2 min bei 4°C permeabilisiert. Wiederum wurden die Schnitte zweimal mit 1x PBS gewaschen. Um die benötigte Menge an Reagenzien zu minimieren, wurde mit einem Fettstift ein Kreis um den Nierenschnitt gezogen. In die Mitte dieses Kreises wurde nun 50 µl eines vorbereiteten „TUNEL Reaktionsmixes“ gegeben und für eine Stunde in einer abgedunkelten feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit 1x PBS und Eindeckeln des Schnittes mit Depex konnten mikroskopische Analysen mit dem Fluoreszenzmikroskop „Axioskop 20“ durchgeführt werden; Bilder wurden mit einer DMC-2 Fluoreszenzkamera aufgenommen.

2.2.13 Mausezucht

Einzelne Tiere der jeweiligen Mauslinien wurden mittels Embryotransfer in eine spezifisch pathogenfreie Zone (SPF) gebracht, so dass diese frei von Infektionen und unter standardisierten Bedingungen gehalten werden konnten. Verpaarungen zur Erhaltung der Zucht wurden fortwährend mit C57Bl/6-Mäusen der Firma „Charles River Laboratories“ durchgeführt, um einen einheitlichen genetischen Hintergrund zu erhalten und etwaige Fehler durch spezifische Mausunterschiede ausschließen zu können. Für nachfolgende Versuchsansätze wurden ca. 3 Monate alte Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet.

2.2.14 Genotypisierung von Mäusen

A. Präparation genomischer DNA

Um die Mäuse in verschiedene Versuchsgruppen einordnen zu können, wurden diese entweder vor oder nach dem Versuch genotypisiert. Zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse für die weitere Zucht wurde in der Regel ein etwa 1cm langes Stück der Schwanzspitze abgeschnitten und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Die Blutung wurde mit Histoacryl® gestillt. Im Fall von neugeborenen Tieren oder Mäusen im Embryonalstadium verwendete man ein entsprechendes Körperteil (z.B. Kopf, Gliedmaßen, Gehirn, usw.) zur Genotypisierung. Konnten die Proben nicht sofort weiter verarbeitet werden, wurden diese bei -80°C aufgehoben.

Anschließend wurde je Probe 700 µl Verdauungslösung zugegeben und ü.N. bei 50°C in einem Rotationsinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben kurz gevortext und für 30 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. 600 µl des Überstandes wurden in ein Reaktionsgefäß mit 600 µl Isopropanol überführt, um daraufhin die DNA durch Schütteln zu fällen. Die ausgefallene DNA wurde nun mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 900 µl 70% Ethanol überführt, um die DNA zu waschen. Nach nochmaliger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgesaugt und das DNA-Pellet für ca. 30 min luftgetrocknet. Je nach Pelletgröße wurde zur DNA nun 100-150 µl TE-Puffer gegeben und diese ü.N. bei 50°C im Rotationsinkubator gelöst. Jetzt konnte die Konzentration der DNA mittels Spektralphotometer gemessen werden.

B. Bestimmung des Genotyps mittels Polymerasekettenreaktion

Die Mauslinien *Lmx1b*^{2loxP}, P2.5-Cre und LC-1 wurden mittels Polymerasekettenreaktion genotypisiert. Hierfür wurde entweder der Thermocycler „MyCycler“ (Biorad) oder „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf) benutzt.

Folgender Mix wurde je Probe angesetzt:

DNA (aus Schwanzproben)	500 ng
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl

Primer 1 (1 µg/µl)	0,5 µl
Primer 2 (1 µg/µl)	0,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
10x Taq-Pol Puffer	5 µl
	→ ad 50 µl H ₂ O

Die PCR erfolgte je nach Gen mit unterschiedlichen Programmen.

Für die Detektion des Gens der Cre-Rekombinase wurde das Primerpaar Cre-F1 und Cre-R1 verwendet.

PCR-Programm (Cre):	I	3 min	bei 94°C	
	II	30 sec	bei 94°C	} 35x
		1 min	bei 60°C	
		2 min	bei 72°C	
	III	5 min	bei 72°C	
	IV	∞	bei 4°C	

Nach dem Auftragen von 15 µl des PCR-Produkts auf ein 2% iges Agarosegel konnte bei positivem Ergebnis eine Bande bei 290 bp, bei negativem Ergebnis keine Bande erwartet werden.

Für die Detektion des *Lmx1b*^{2loxP}-Gens wurde das Primerpaar Lmx1b (5'-lox) und Lmx1b (3'-lox) verwendet.

PCR-Programm (<i>Lmx1b</i> ^{2loxP}):	I	5 min	bei 94°C	
	II	45 sec	bei 94°C	} 35x
		45 sec	bei 57°C	
		45 sec	bei 72°C	
	III	5 min	bei 72°C	
	IV	∞	bei 4°C	

Nach dem Auftragen von 15 µl des PCR-Produkts auf ein 2% iges Agarosegel konnte im Falle des Wildtyp-Allels eine Bande bei 220 bp detektiert werden, im Falle des geflochten Allels eine Bande bei 330 bp.

C. Bestimmung des Genotyps mittels Southern Blot

Der Nachweis des Gens der konventionellen *Lmx1b*-Knockout Maus und der Linie P2.5-rtTA konnte mittels einer selbst hergestellten radioaktiven Sonde erbracht werden.

Nach Präparation der genomischen DNA (s.a. 2.2.3 A) wurde diese durch einen weiteren Restriktionsverdau mit *BamH* I vollständig geschnitten.

Ansatz Restriktionsverdau:	DNA (aus Schwanzproben)	10 µg
	<i>BamH</i> I (100 U/µl)	0,5 µl
	10x <i>BamH</i> I-Puffer	3 µl
	Spermidin	3 µl
	100x BSA (10 mg/ml)	0,3 µl
		→ ad 30 µl H ₂ O

Dieser Ansatz wurde ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert, dann mit 7,5 µl 5x Probenpuffer vermischt, kurz abzentrifugiert und auf ein 1% iges Agarosegel aufgetragen. Die darauf folgende Elektrophorese wurde so lange durchgeführt, bis das Bromphenolblau etwa die Mitte des Agarosegels erreicht hatte, was auch unter UV-Licht kontrolliert wurde. Zur einfacheren späteren Detektion wurde auch eine Positivkontrolle mit aufgetragen.

Anschließend wurde dieses Agarosegel zunächst in einer Glasschale mit Denaturierungslösung für 45 min bei RT, folgend für 45 min in Neutralisierungslösung und abschließend für 15 min in 2x SCC langsam geschwenkt. Das vorbereitete Gel wurde nun nach unten gezeigtem Schema (Abb. 5) im Southern Blot aufgebaut. Hierzu ergab sich eine Schichtung aus einer Lage Chromatographie-Papier, welche in ein 20x SSC-Reservoir getaucht war, dem seitenverkehrt aufgelegten Gel, einer Nylonmembran, drei Lagen Chromatographie-Papier, einem ca. 20 cm hohen Stapel Küchentücher und zuletzt einem ~500 g schweren Gewicht. Über Nacht transferierte so die DNA

auf die Nylonmembran. Am nächsten Morgen wurde die Nylonmembran zunächst kurz luftgetrocknet und zur Fixierung der DNA auf der Membran für 2 Stunden bei 80°C „gebacken“.

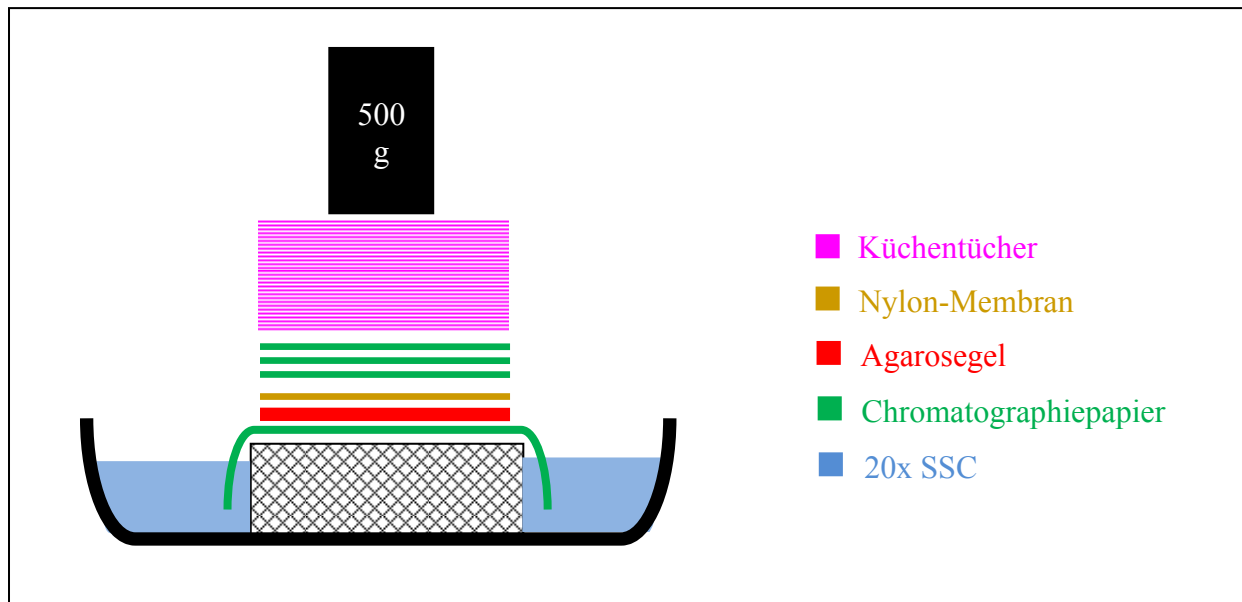


Abb. 5: Aufbau des Southern Blots. In einer Wanne mit 20x SSC Puffer taucht eine Lage Chromatographiepapier ein (grün), auf der das Agarosegel (rot) gelegt wurde. Anschließend folgt die Nylonmembran (braun), auf die die DNA übertragen wird. Dieser Transfer wurde durch die darauffolgenden 3 Lagen Chromatographiepapier (grün) und dem Stapel Küchentücher (lila) bewerkstelligt. Zuletzt beschwerte ein Gewicht von ~500 g den Aufbau.

Um spezifische Banden auf der Nylonmembran detektieren zu können, musste sowohl eine radioaktive Sonde als auch die Nylonmembran präpariert werden. Die Membran wurde hierfür zunächst für 3 h in Hybridisierungslösung bei 60°C im Rotationsschüttler im Hybridisierungsröhrchen unter andauerndem Drehen inkubiert.

Parallel hierzu wurde die Sonde nach folgendem Protokoll hergestellt:

1. 2 µl Sonden-DNA (100 ng/µl) ("LMX1B 48B2" oder „rtTA“)
2. 1 µl Random-Primer (60 ng/µl)
3. 7 µl H₂O
4. 5 min bei 100°C inkubieren, dann auf Eis
5. 2 µl 10x Klenow-Puffer
6. 2 µl 0,5 mM d(GAT)TP
7. 5 µl α-³²P-dCTP (10 µCi/µl)
8. 1 µl Klenow Fragment (5 U/µl)
9. Inkubation bei RT für 3 h

Um nicht eingebautes α -³²P-dCTP aus der Sonde zu entfernen, wurde der Ansatz nach folgendem Protokoll über Micro Spin Column-Säulchen gereinigt:

1. Säulchen kurz vortexen, unteren Teil abknicken und in ein 2 ml Reaktionsgefäß stecken
2. 1 min bei 2700 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
3. 30 µl 1x TE-Puffer wird zu der radioaktiven Sonde pipettiert und auf die vorbereitete Säule gegeben
4. 2 min bei 2700 rpm zentrifugieren
5. Durchfluss für 5 min bei 100°C im Heizblock inkubieren
6. kurz abzentrifugieren, um Flüssigkeit zu sammeln

Die gereinigte Sonde wurde nun mit frischer Hybridisierungslösung auf die Membran gegeben und ü.N. bei 60°C unter ständiger Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 20 min bei 60°C mit 2x SSC gewaschen, um nicht gebundene Sonde zu entfernen. Darauf folgten zwei Waschschrte für jeweils 10 min bei 60°C mit 0,2x SSC/0,1% SDS. Anschließend wurde noch einmal 5 min bei RT mit 2x SSC in einer Glaswanne gewaschen.

Nach dem Waschen wurde die Membran in Cellophanfolie eingewickelt, eine Imaging Plate 2025 (Fuji Film) aufgelegt und für mindestens 4 h in einer Filmkassette inkubiert. Danach konnte die Imaging Plate mittels des PhosphoImager FIA-5000 eingescannt und ausgewertet werden.

2.2.15 Nierenentnahme und Perfusion von Mäusen

Um Nieren von Mäusen für Strukturanalysen gewinnen zu können, mussten diese zunächst mit 500 - 900 µl Narcoren anästhesiert werden. Nach der Betäubung wurden diese mit Klebebändern an den Pfoten fixiert und der Bauch mit 70% Ethanol eingesprüht. Darauffolgend wurden sowohl die Arteriae iliacae möglichst weit distal als auch die Aorta abdominalis möglichst weit proximal abgeklemmt und ein Faden unter Aorta abdominalis und Vena cava inferior durchgezogen. Anschließend wurde eine mit Heparinlösung gefüllte Spritze mit einem ebenso gefüllten aufgesteckten Schlauch vorbereitet. Diese Schlauchspitze wurde in ein kleines, in die Aortenvorderwand geschnittenes Loch oberhalb der Bifurkation eingeführt und mittels des Fadens befestigt. Nachfolgend wurde der Schlauch mit Heparinlösung kurz hinter der Spritzenspitze abgeschnitten

und auf einen mit 4% PFA/1x PBS gefüllten Perfusionsschlauch gesteckt, welcher mit einem Kompressor verbunden war. Dieser Kompressor wurde auf einen Arbeitsdruck von 0,22 bar eingestellt und war mit einem Reservoir mit Perfusionslösung verbunden. Nun wurde in die Vena cava oberhalb des Knotens ein Loch geschnitten, die Klemme auf der Aorta entfernt und die Maus für 3 Minuten mit 4% PFA/1x PBS perfundiert. Nach der Perfusion wurden die Nieren bzw. Nierenhälften entweder in ein Gefäß mit 4% PFA/1x PBS (für Paraffineinbettung) oder in ein Gefäß mit 2% GA/1x PBS (für Elektronenmikroskopie) gegeben und für weitere 2 Tage bei 4°C gelagert. Von da an wurden sie entweder direkt für die Einbettung weiter behandelt oder zur Aufbewahrung in Natriumazidlösung umgelagert.

Wurden Nieren oder andere Organe für eine RNA-Präparation benötigt, wurden diese nicht perfundiert, sondern sofort nach der Narkose entnommen und in einem Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.16 Präparation von Mäusenieren

A. Präparation für Lichtmikroskopie

Perfundierte und in Natriumazid gelagerte Nierenhälften wurden zunächst kurz zweimal in 1x PBS gewaschen, um Reste von Natriumazid zu entfernen. Dann wurden die Hälften in kleine Gitterkäfige gegeben und gemeinsam in ein Becherglas gestellt, in welchem folgende Lösungen entsprechend Protokoll nacheinander ausgetauscht wurden. Die Inkubation erfolgte bei 4°C unter leichtem Schwenken.

1. 2x 1 h in 1x PBS
2. 1x 1 h in 50% Isopropanol
3. ü.N. in 70% Isopropanol

Am nächsten Morgen wurden die Gitterkäfige in einen Einbettautomaten überführt, der selbstständig die Käfige unter fortwährender Rotation in verschiedene Lösungen nacheinander transferierte. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und folgende, jeweils frische, Lösungen nacheinander verwendet:

4. 1x ½ h in 70% Isopropanol
5. 1x 1 h in 80% Isopropanol
6. 2x 1 h in 96% Isopropanol
7. 3x 1½ h in 99% Isopropanol
8. 2x 1 h in Xylol
9. 3x 4 h in Paraplast (bei 60°C)

Anschließend wurden die Nierenhälften in je eine Einbettform überführt, diese mit Paraplast gefüllt und die Schnittfläche der Niere nach unten orientiert. Zum Aushärten wurden die Formen mit den Nierenhälften ü.N. bei 4°C gelagert.

Nach dem Aufbringen auf kleine Holzklötzchen konnten mittels eines Mikrotoms 7 µm dicke Schnitte von den Nieren gefertigt werden. Diese Schnitte wurden zunächst auf einem warmen Wasserbad geglättet, dann auf einen Objektträger überführt und weiter auf einer ca. 40°C warmen Heizplatte inkubiert, so dass sich Falten ausglätten konnten. Mit Hilfe einer Testfärbung mit Richardson-Färbelösung konnte unter dem Mikroskop festgestellt werden, ob der gewünschte Bereich angeschnitten wurde. War dies der Fall, wurden jetzt weitere Schnitte von dem Präparat genommen, diese ebenso von Falten befreit und auf Objektträger überführt. Diese wurde ü.N. in einem 37°C Brutschrank belassen, um die Nierenschnitte auf dem Objektträger zu fixieren.

B. Präparation für Elektronenmikroskopie

Die Nierenhälften, die für eine Betrachtung im Elektronenmikroskop vorgesehen waren, wurden zunächst zweimal in 1x PBS gewaschen, um vorhandenes Natriumazid zu entfernen. Anschließend wurden die Hälften gemäß folgendem Protokoll bei Raumtemperatur behandelt:

1. 4x 1 h in 1x PBS
2. über Nacht in 2% Osmiumtetroxid
3. 4x 5 min in 1x PBS
4. 2x 10 min in 50% Ethanol
5. 2x 10 min in 70% Ethanol
6. 2x 10 min in 80% Ethanol
7. 2x 10 min in 90% Ethanol

8. 2x 10 min in 100% Ethanol
9. 1x 20 min in Aceton/Ethanol (1:1)
10. 2x 20 min in Aceton
11. 1x 2 h in Aceton/Epon (2:1)
12. 1x 2 h in Aceton/Epon (1:1)
13. über Nacht in Aceton/Epon (1:2)
14. 1x 2 h in Epon (bei 30°C)
15. 2 Tage in Epon (bei 60°C)

Die Epon-Stücke konnten nun auf einem Ultramikrotom geschnitten werden. Für die Elektronenmikroskopie wurden 50 - 70 nm dicke Schnitte gefertigt, die auf Netzchen aufgetragen wurden. Diese Netzchen mit den jeweiligen Schnitten der Nieren wurden nun im Elektronenmikroskop betrachtet und dokumentiert.

C. PEI-Färbungen für Elektronenmikroskopie

Aufgrund von veränderten Ladungsverteilungen entlang der glomerulären Basalmembran kann eine erhöhte Durchlässigkeit für Proteine und andere Solute zu beobachten sein. Um diesen Punkt genauer untersuchen zu können, kann man sich die Verwendung von Polyethylenimin (PEI) zu Nutze machen, da dieses an anionische Ladungen der glomerulären Basalmembran bindet und diese dadurch als schwarze Punkte sichtbar werden. Diese können somit ausgezählt werden.

Zur Durchführung der Experimente wurden Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen über 7 Tage Doxzyklin ins Trinkwasser verabreicht, wodurch die Inaktivierung von *Lmx1b* bewirkt wurde und eine hohe Proteinurie gemessen werden konnte. Ebenso wurden Mäuse ohne *Lmx1b*-Knockout als Kontrolle mitgeführt. Nach Perfusion der Mäuse und Entnahme der Nieren wurden Teile des Cortex in kleine Würfel geschnitten und für 45 min in 0,5% Polyethylenimin gelegt. Anschließend folgte eine histologische Aufbereitung für das Elektronenmikroskop wie bereits beschrieben (s.a. 2.2.16 B).

Betrachtete man nun Schnitte dieser Nieren, konnte man eine Färbung von schwarzen Punkten entlang der glomerulären Basalmembran beobachten. Eine Auszählung der Punkte auf den Aufnahmen und ein Vergleich der Versuchsgruppen wurde nun möglich.

D. PAS-Färbung von Paraffinschnitten

Zur strukturellen Analyse der Nierenschnitte, wurden diese mit Hilfe der Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung) gefärbt. Hierbei werden kohlenhydratreiche Bestandteile wie Glykoproteine, Glykogen oder auch Cellulose rot-violett angefärbt [Welsch, 2003].

Hierfür wurden die vorbereiteten Schnitte (s.a. 2.2.16 A) nach folgendem Protokoll entparaffiniert und anschließend gefärbt. Mehrere Schnitte wurden dabei in einen Glasträger gesteckt und mit diesem so von Färbebecken zu Färbebecken gehoben und eingetaucht. Nach der Eindeckung wurden die Schnitte im Mikroskop unter 5-facher Vergrößerung betrachtet und abfotografiert. Teilbereiche der Bilder wurden schließlich zu einem großen Gesamtbild zusammengefügt.

- | | | |
|--|---|--------------------------|
| 1. 2x 10 min in Xylol | } | <i>Entparaffinierung</i> |
| 2. 2x 1 min in 100% Isopropanol | | |
| 3. 2x 1 min in 96% Isopropanol | | |
| 4. 1x 1 min in 80% Isopropanol | | |
| 5. 1x 1 min in 70% Isopropanol | | |
| 6. 1x 2 min in H ₂ O | | |
| 7. 1x 10 min in 1% Periodsäure | } | <i>Färbung</i> |
| 8. 3x kurz mit H ₂ O spülen | | |
| 9. 1x 15 min in Schiff's Reagenz | | |
| 10. 3x 1 min in Sulfitwasser | | |
| 11. 5 min unter fließendem Leitungswasser spülen | | |
| 12. 1x 2 sek in 0,1% HCl /70% Ethanol tauchen | | |
| 13. 5 min unter fließendem Leitungswasser spülen | } | <i>Dehydrierung</i> |
| 14. 1x 3 min in 70% Isopropanol | | |
| 15. 1x 3 min in 80% Isopropanol | | |
| 16. 1x 3 min in 96% Isopropanol | | |
| 17. 1x 3 min in 100% Isopropanol | | |

18. 2x 5 min in Xylol
19. mit Depex eindeckeln
- 3 - 4 Tage bei RT trocknen lassen

E. HE-Färbung von Paraffinschnitten

Ebenso wie die PAS-Färbung diente auch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zur strukturellen Analyse der Nierenschnitte. Hierbei werden Kerne, Ribosomen oder das raue endoplasmatische Retikulum blauviolett gefärbt, während Kollagenfasern und Zytoplasma eine rote Färbung zeigen [Welsch, 2003].

Vorbereitete Schnitte wurden in einem Glaträger gesammelt und gemeinsam in verschiedene Becken eingetaucht. Die Abläufe der Entparaffinierung und der Eindeckelung entsprechen denen der PAS-Färbung. Die einzelnen Schritte der Färbung wurden entsprechend folgender Beschreibung durchgeführt.

- 1.-5. Entparaffinierung (s.a. 2.2.16 D)
 6. 1x 5 min in H₂O
 7. 1x 3 min in Mayer's Hämalaun
 8. 1x 2 min unter fließendem Wasser spülen
 8. 1-2x 2 sek in 0,1% HCl /70% Isopropanol
 9. 10 min unter fließendem Wasser spülen
 10. 1x 2 sek mit destilliertem H₂O spülen
 11. 1x 3 min in 0,5% Eosin G + 3 Tropfen Eisessig (ad 100 ml H₂O)
 11. 2x 2 sek mit destilliertem H₂O spülen
 12. 1x 2 sek in 70% Isopropanol
 13. 1x 2 sek in 80% Isopropanol
 14. 1x 2 min in 96% Isopropanol
 15. 2x 5 min in 100% Isopropanol
 16. 2x 10 min in Xylol
 17. mit Depex eindeckeln
 - 3 - 4 Tage bei RT trocknen lassen
- } *Dehydrierung*

F. RNA-Präparation

Entnommene Nieren wurden sofort in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren; bis zur weiteren Verwendung wurden die Nieren bei -80°C gelagert. Zur Gewinnung der RNA aus Geweben wurde der „Nucleo Spin RNA L“ Kit von Macherey-Nagel verwendet, die Präparation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (s.a. 2.2.9 A). Erhaltene RNA wurde zuletzt in 20 µl RNase-freies H₂O gelöst und qualitativ mittels eines Agarsegels kontrolliert.

2.2.17. Induktion des *Lmx1b*-Knockouts bei Mäusen

Um bei Mäusen einen gewünschten *Lmx1b*-Knockout zu induzieren, mussten zunächst drei spezifische Mauslinien miteinander gekreuzt werden: die *Lmx1b*^{2loxP}-Linie, P2.5-rtTA und LC-1. Die Kombination dieser drei Linien ergab die Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Linie, in der durch Gabe von 2 mg/ml Doxyzyklin und 5% Sucrose ins Trinkwasser *Lmx1b* spezifisch in den Podozyten ausgeschaltet wurde. Nach Versuchsbeginn wurde alle 3 - 4 Tage das Trinkwasser gewechselt.

2.2.18 Präparation von Glomeruli

Da *Lmx1b* in der Niere ausschließlich in den Podozyten exprimiert wird, war es teilweise erforderlich, reine Glomeruli zu präparieren, um sonstige störende Signale aus der Gesamt-Niere zu minimieren. Für die Präparation wurde nach einem abgeänderten Protokoll von Dr. Andreas Blutke („Magnetic Isolation of Murine Kidney Glomeruli for Transcript-Profiling and Proteomic Analysis by Perfusion with Paramagnetic Beads“, Institut für Tierpathologie, LMU München) vorgegangen. Die einzelnen Präparationsschritte stellen sich wie folgt dar:

1.Schritt: Waschen der Beads:

- Beads-Suspension für 2 min vortexen
- 200 µl dieser Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Reaktionsgefäß für 1 min am Magneten platzieren
- Puffer mit einer Pipette abnehmen

- Reaktionsgefäß vom Magneten entfernen
- 1 ml Puffer A1 zugeben und Reaktionsgefäß für 2 min vortexen
- Reaktionsgefäß für 1 min am Magneten platzieren
- Puffer mit einer Pipette abnehmen
- Reaktionsgefäß vom Magneten entfernen
- 200 µl Puffer A1 zugeben

2. Schritt: Blockieren der Beads:

- gewaschene Beads für 1 min vortexen
 - 200 µl Blockierungslösung zugeben
 - für 16-20 h bei Raumtemperatur unter langsamer Rotation inkubieren
 - Reaktionsgefäß für 1 min am Magneten platzieren
 - Puffer mit einer Pipette abnehmen, Reaktionsgefäß vom Magneten entfernen
 - 200 µl 1x PBS zugeben
 - Reaktionsgefäß für 1 min vortexen
 - Reaktionsgefäß am Magneten platzieren
 - Puffer mit einer Pipette abnehmen
 - Reaktionsgefäß vom Magneten entfernen
 - Beads können nun verwendet werden
- 3x wiederholen

3. Schritt: Herstellung der Perfusionslösung:

- 40 ml 1x PBS in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen geben und auf 40 °C erwärmen
- 200 µl der vorbereiteten Beads zugeben
- für 1 min vortexen

4. Schritt: Ablauf der Perfusion:

- Betäubung der Maus mittels Narcoren
- Öffnung der Bauch- und Brusthöhle, Freilegung des Herzens sowie der Aorta abdominalis
- Die Perfusionsvorrichtung wurde aus einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gefertigt, an dessen offener Spitze eine Kanüle (30 G, 0,3 mm x 13 mm) befestigt wurde. In den Deckel des 50 ml Zentrifugenröhrchens wurde mittels eines Schlauches eine Verbindung zu einer 60 ml Spritze hergestellt, welche mit einem Blutdruckmessgerät verbunden war.

- Zur Perfusion wurde das Zentrifugenröhrchen mit 40 ml Perfusionslösung befüllt und das System geschlossen.
- Mit der Kanüle wurde nun in den linken Ventrikel des Herzes eingestochen, die Aorta abdominalis durchtrennt und mit einem möglichst konstanten Druck von 60 mm Hg perfundiert, bis der Puffer aufgebraucht war

5. Schritt: Entnahme der Nieren und Isolation der Glomeruli:

- die Nieren wurden entnommen, die Kapsel entfernt, der Rest auf einem Wägeschiffchen gewogen und mittels einer Rasierklinge zerkleinert
- die Nierenstückchen wurden daraufhin in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Kollagenase A-Verdaulösung für 30 min bei 37°C inkubiert (dabei alle 5 min geschwenkt)
- nach dem Verdau wurde das Gewebe mit dem umgedrehten Stempel einer Spritze durch ein 100 µm Zellsieb zusammen mit 7 ml 1x PBS gedrückt. Betrug das Gewicht einer Niere >400 mg, wurde die Niere auf 2 Zellsiebe halbiert und jeweils mit einer Hälfte verfahren (alle Schritte werden auf Eis durchgeführt)
- Überführung der 7 ml in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen
- zweimaliges Waschen des 50 ml Zentrifugenröhrchen mit je 1,5 ml 1x PBS und ebenfalls Überführung in das 12 ml Zentrifugenröhrchen
- Platzierung des 12 ml Zentrifugenröhrchen am Magneten für 7 Minuten
- Absaugen der Waschlösung und Kontrolle im Binokular
- Entfernung des 12 ml Zentrifugenröhrchens vom Magneten und Zugabe von 10 ml frischen 1x PBS (4°C), Lösen der Glomeruli durch leichtes Schwenken des Zentrifugenröhrchens
- Platzierung des Zentrifugenröhrchens am Magneten für weitere 7 min
- Absaugen der Waschlösung und Wiederholung des Waschschrittes mit 6 ml 1x PBS
- Lösen der Glomeruli in 6 ml 1x PBS und Überführung auf ein 100 µm Zellsieb, welches auf einem 50 ml Zentrifugenröhrchen steckt
- Sieb wird mit 2 ml 1x PBS nachgespült (kein Durchdrücken der Glomeruli)
- Überführung in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen und Platzierung an einem Magneten für 5 min
- Nach Absaugen der Waschlösung und deren Kontrolle auf Reinheit der Glomeruli wurden diese Waschschritte so lange mit 10 ml 1x PBS wiederholt, bis der

- gewünschte Reinheitsgrad (95-100%) erreicht wurde
- Aufnahme der Glomeruli in 1,5 ml 1x PBS und Überführung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß
 - das Reaktionsgefäß wurde daraufhin für 5 min am Magneten platziert und der Überstand abgesaugt
 - war die gewünschte Qualität der Glomeruli erreicht, wurden diese im jeweiligen Medium aufgenommen und entsprechend weiter verwendet

2.2.19 Auswachsen von Zellen aus Glomeruli

Nach der Präparation der Glomeruli konnten diese für bis zu zwei Passagen in Kultur gehalten werden. Ein weiterer Assay zur Feststellung der Adhäsion der Podozyten an der glomerulären Basalmembran war, dass die aus der Präparation gewonnen Glomeruli (s.a. 2.2.18) in Kultur gehalten und anschließend für 4 Tage beobachtet und abfotografiert wurden. Hierbei wurden die Glomeruli auf mit Fibronektin beschichteten Kulturschalen ausgesät und 4 Tage mit DMEM Medium bei 37°C im Inkubationsschrank kultiviert. Nach 4 Tagen wurden von den jeweiligen Tieren, d.h. den induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen und nicht-induzierten Mäusen, Aufnahmen gemacht und ausgewachsene Podozyten ausgezählt. Dieses wurde in Relation zur Gesamtzahl an Glomeruli gesetzt.

2.2.20 Aufbereitung von Mäuse-Urin

Um festzustellen, ob Mäuse eines Versuchsansatzes eine Proteinurie gebildet hatten, wurde nach zweierlei Verfahren vorgegangen. Zum einen hielt man Mäuse für 24 h in einem Stoffwechselkäfig, in dem der Urin über 24 h gesammelt werden konnte. Dieser Urin wurde für 15 min bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt; ebenso wurde das Volumen des Urins bestimmt. Von diesem Urin konnte nun eine Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel (s.a. 2.2.8 B) oder eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (s.a. 2.2.8 A) durchgeführt werden. Gaben Mäuse keinen bzw. kaum Urin in den Stoffwechselkäfig ab, wurde versucht, wenigstens einen Tropfen Urin zu bekommen, welcher direkt auf Proteingehalt mittels Bradford-Bestimmung untersucht wurde. So konnte zumindest annähernd die Höhe der Proteinurie festgestellt werden.

2.2.21 Membranpotential-Messung

Um festzustellen, ob eine Änderung des Membranpotentials ursächlich für den Verlust von Podozyten ist, wurde mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode die elektrische Aktivität der Ionenkanäle der Podozyten vermessen. Bei der sog. „Slow-Whole-Cell“-Methode wird zunächst die Patchpipette auf die Zelle aufgesetzt und die Zellmembran durch Gabe von 100 mg/l Nystatin in die Pipettenlösung permeabilisiert. Es war nun somit ein elektrischer Zugang zum Zellinneren gelegt und eine Messung des über die Zellmembran fließenden Stroms möglich geworden. Somit können jetzt Rückschlüsse auf die Aktivität bestimmter Ionenkanäle ermöglicht werden (Reichold M., Dissertation 2008).

Für unsere Analysen wurden zunächst Glomeruli von induzierten *Lmx1b*-Knockout Mäusen entnommen, welche nach einer Woche Induktion mit 200 mg/ml Doxzyzyklin eine heftige Proteinurie entwickelt hatten; als Kontrolle dienten Glomeruli von nicht-induzierten Mäusen. Die Messungen (durchgeführt vom Lehrstuhl für Physiologie; Prof. Dr. R. Warth) wurden zum einen an Podozyten, die direkt an den Glomeruli gebunden waren, und zum anderen an von Glomeruli ausgewachsenen Podozyten durchgeführt. Alle Experimente wurden bei 37°C Badtemperatur und vorgewärmten Lösungen durchgeführt, wobei das Bad permanent gespült wurde, um eine Zellschädigung durch austretendes K^+ aus der Referenzelektrode zu vermeiden. Patchpipetten wurden aus Glaskapillaren auf einen Widerstand von ca. 10 M Ω ausgezogen. Nach Aufsetzen der Patchpipette auf die Podozyten wurde zunächst gewartet, bis sich ein stabiles Membranpotential eingestellt hatte. Anschließend wurden die Zellen mit einer 10 mM Hoch-Glucose Lösung (Glucose-10-Lösung) behandelt und wiederum gewartet, bis sich das Membranpotential stabilisiert hatte. Danach wurde die alte Lösung entfernt und eine frische Ringer-ähnliche Lösung, versetzt mit 5 mM Glucose, (=Kontrolllösung) zugegeben. Bei den Messungen wurde ein EPC-7-ähnliches Gerät als Verstärker eingesetzt (Protokoll nach Reichold M., Dissertation 2008).

2.2.22 Anti-GBM-Serum

A. Herstellung

Gewinnung von Glomeruli

Zur Herstellung dieses Serums wurden 150 Nieren von Mäusen entnommen und diese sofort in eiskaltes 1x PBS überführt. Alle Folgeschritte wurden nun im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Nieren wurden mit einer Rasierklinge kleingeschnitten und anschließend durch ein Siebgestell gedrückt, welches sich aus drei Einzelsieben zusammensetzte. Von oben nach unten hatten die Siebe eine Maschengröße von 63 µm, 75 µm und 38 µm. Mehrmals wurde mit eiskaltem 1x PBS nachgewaschen, so dass sich im untersten Sieb letzten Endes die Glomeruli sammelten. Nach einer mikroskopischen Kontrolle bezüglich der Reinheit wurde das Gemisch nochmal bei 800 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet, in dem sich nun die Glomeruli befanden, wurde in 50 ml Homogenisierlösung aufgenommen und mittels eines Ultraschallgerätes mit 3 kurzen Stößen auf Eis aufgeschlossen. Danach wurde die Lösung für 3 h im Kühlraum in einem Rotationsrad inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 40 ml H₂O aufgenommen und wieder auf Eis mit drei kurzen Stößen ultraschallbehandelt. Es wurde wiederum zentrifugiert. Nun wurde das Pellet in 40 ml Natriumdesoxycholat aufgenommen und erneut mit 3 kurzen Ultraschallstößen homogenisiert. Anschließend wurde das Gemisch für weitere 2 h im Kühlraum auf einem Rotationsrad inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit folgten noch einmal 4 Zyklen mit Aufnahme in 20 ml H₂O, Homogenisierung mit 3 Ultraschallstößen und Zentrifugation. Zuletzt wurde das Pellet in 1x PBS aufgenommen und in 12 Aliquots á 500 µl portioniert; diese wurden bei -20°C eingefroren.

Produktion von anti-GBM-Serum

Die Immunisierung von 3 „Chinchilla Buster“ Kaninchen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Echtenacher (Lehrstuhl für Immunologie, Klinikum Regensburg) durchgeführt. Um die gewünschte Produktion des Antiserums in Gang zu bringen, wurde den Kaninchen bei der ersten Immunisierung eine Emulsion aus 500 µl Antigen und 500 µl komplettem Freund's Adjuvans subkutan injiziert. Nach je drei Wochen fanden weitere Immunisierungen statt, bei der nun allerdings eine Emulsion aus 500 µl Antigen und 500 µl inkomplettem Freund's Adjuvans injiziert wurden. Ab der zweiten Immunisierung wurden jeweils mehrere Milliliter Blut 5-7 Tage nach der letzten Immunisierung abgenommen. Dieses Blut wurde zunächst für 2 h bei RT, dann ü.N. bei 4°C stehen gelassen und am nächsten Tag für 10 min bei 4°C und 2.400 rpm in einem 50 ml

Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Der Überstand, der jetzt das Serum darstellt, wurde abgenommen und in mehrere Reaktionsgefäße aliquotiert. Das Serum wurde daraufhin durch immunhistologische Färbungen auf seine Wirksamkeit getestet, wobei das Serum noch bei einer Verdünnung von 1:10.000 die glomeruläre Basalmembran färben sollte. 5 Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Kaninchen das Blut vollständig entnommen und ebenso präpariert. Die Wirksamkeit des Serums in vitro wurde durch Bildung einer Proteinurie in Mausversuchen bestätigt.

B. Anwendung

Mäuse wurden zunächst mit 0,2 mg Kaninchen IgG präimmunisiert. Hierfür wurde das Kaninchen IgG zunächst auf 2 µg/µl verdünnt und anschließend 1:1 mit komplettem Freund's Adjuvans in einem Drei-Wege-Hahn-System vermischt, so dass eine stabile milchig-weiße Emulsion entstanden war. Hiervon wurden je Maus 200 µl subkutan auf der Bauchseite injiziert, wobei jeweils 100 µl auf der linken und rechten Seite als Depot eingespritzt wurden.

6 Tage nach der Präimmunisierung wurden die Mäuse mit einer Ketamin/Xylazin-Mischung betäubt und ihnen jeweils 250 µl des anti-GBM-Serums hinter den Augen gespritzt. Von diesem Zeitpunkt an, dies stellt den Tag 0 dar, wurde von den Mäusen alle zwei Tage der 24 h - Urin in Stoffwechselkäfigen gesammelt. Dieser Urin wurde aufbereitet und auf seinen Proteingehalt getestet. Nach 10 Tagen wurden die Mäuse betäubt, perfundiert und die Nieren für weitere Analysen entnommen.

2.2.23 Gewinnung von Primärkulturen verschiedener Zelltypen

A. MEFs

Gewinnung

Bei der Präparation von „mouse embryonic fibroblasts“ (MEFs), Fibroblasten aus Mäuseembryonen, wurden schwangeren Mäusen die Embryos am Embryonaltag 14.5 aus dem Uterus entnommen. Um diesen Tag eindeutig bestimmen zu können, wurde die Verpaarung der heterozygoten Elterntiere nur über eine Nacht durchgeführt und die Bildung eines Plaques am nächsten

Tag kontrolliert. An E14.5 wurden die Mäuse narkotisiert, mit 70% Ethanol abgespritzt und die Bauchdecke geöffnet, so dass die Gebärmutter sichtbar war. Die Embryos wurden entnommen, in eine P10-Kulturschale mit eiskaltem 1x PBS überführt und in neuen Schalen vereinzelt. Sowohl der Kopf als auch die inneren Organe wurden entfernt. Der Rest des Körpers wurde durch ein Zellsieb mit 100 µm Maschengröße [BD Falcon] gedrückt und einmal mit 1x PBS nachgewaschen. Die verbleibenden Stücke wurden mit einer 10 ml Spritze und einer 16G-Kanüle aufgenommen. Nach zweimaligen Auf- und Abnehmen des zerkleinerten Körpers wurden die Stücke mit 5 ml Trypsin/EDTA für 60 min bei 37°C in einem 50 ml Röhrchen unter ständiger Rotation inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 100 g wurde das Pellet in DMEM-Medium mit 20% FCS und 1x Penicillin/Streptomycin aufgenommen und in Kulturflaschen überführt. Nach eintägiger Inkubation wurde das alte Medium gegen neues ersetzt, um Zellrückstände zu entfernen.

Jetzt konnten die MEFs durch Kultivierung und maximal einmaliges Passagieren vermehrt werden. Wurden die MEFs nicht sofort benötigt, wurden sie bei -80°C eingefroren, ansonsten wurden sie den Versuchsansätzen zugeführt.

Zur genaueren Betrachtung von Vorgängen, die von *Lmx1b* gesteuert werden könnten, wurden auch Ansätze durchgeführt, die die Bildung von MEFs nur aus den Gliedmaßen vorsahen. Hierzu wurde das vorherige Protokoll insofern abgewandelt, dass bei der Präparation der Mäuse nicht die gesamte Maus zerschnitten wurde, sondern im Falle der Gliedmaßen-MEFs nur die vorderen und hinteren Gliedmaßen zerstückelt wurden. Ab dann wurde ebenso wie im Protokoll für die Gesamtpräparation verfahren.

Stimulation

Hatten MEFs eine ausreichende Dichte erreicht, wurden sie mit verschiedenen Reagenzien behandelt, um eine Stimulierung des Immunsystems zu erreichen. Folgende Reagenzien wurden zum Kulturmedium zugegeben, um unterschiedliche Toll-like-Rezeptoren zu stimulieren und so die Expression von Interferon-induzierbaren Genen oder Interferonen selbst zu steigern.

Reagens	Konzentration	Dauer
LPS	10 µg/ml	24 h
IFN γ	500 U/ml	8 h
Peptidoglykan	10 µg/ml	6 h
polyI:C	25 µg/ml	8 h

Nachdem die Reagenzien für die jeweilig notwendige Zeitdauer auf die MEFs gewirkt hatten, wurden die Zellen geerntet und für die RNA-Präparation aufbereitet.

B. ELISA von primären Milzzellen

Mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mack (Klinik für Innere Medizin II, Nephrologie) wurde von neugeborenen konventionellen *Lmx1b*^(+/+), *Lmx1b*^(+/-) und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen die Milz entnommen. Diese wurde daraufhin von umliegendem Fett und Gewebe befreit, mit einer sterilen Klinge zerkleinert und mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch ein Nylonsieb mit einer Maschenweite von 70 µm gedrückt. Dieses Nylonsieb befand sich in einer Petrischale, in welcher eiskaltes 5 ml RPMI/10% FCS vorgelegt wurde. Nach einmaligem Nachspülen mit eiskaltem 5 ml RPMI/10% FCS wurde die Suspension bei 1.400 rpm und 4°C für 6 min zentrifugiert. Nach einem nochmaligen Filterschritt mit einem 40 µm Nylonsieb und einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in Kulturmedium aufgenommen (RPMI 1640 mit 10% FCS und 1x Penicillin/Streptomycin) und in 96-Loch-Flachbodenplatten überführt. Während der 24 h Kultivierung der Milzzellen wurden diese durch Zugabe von 10 ng/ml IL-3 stimuliert, um basophile Granulozyten zu aktivieren. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden die IL-6 Konzentrationen der Zellkulturüberstände mittels ELISA untersucht (durchgeführt in der Klinik für Innere Medizin II, Prof. Dr. M. Mack). Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte Milzzellen.

C. Makrophagen

Bei der Präparation der Makrophagen wurde C57Bl/6-Mäusen entweder 1 ml 1x PBS oder 1 ml 3% Thioglykolat intraperitoneal injiziert, um Makrophagen zu aktivieren. Nach einem Tag (im Fall von PBS) bzw. vier Tagen (im Fall von Thioglykolat) wurden die Mäuse durch Dekapitation getötet, mit einer Spritze 10 ml eiskaltes Medium in den Bauchraum gespritzt und die Maus sanft bewegt. Unter Zuhilfenahme einer Spritze wurde nun wieder der Puffer abgesaugt und in eine Kulturflasche mit Medium gegeben. Nach 2 h wurden nicht anhaftende Zellen durch zweimaliges Waschen entfernt und der Erfolg der Präparation mikroskopisch überprüft. Nach 3-4 Tagen wurden die Makrophagen geerntet und von ihnen RNA präpariert.

D. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden vom Lehrstuhl für Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Universität Regensburg von Prof. Dr. Falk präpariert. Um dendritische Zellen zu erhalten, wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen vorgegangen. Zum einen wurden dendritische Zellen aus dem Knochenmark einer Maus gewonnen. Hierfür wurde das Knochenmark aus dem Oberschenkel einer Maus entnommen, dieses für eine Woche mit 5 ng/ml GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor) in Kulturplatten kultiviert und anschließend für 16 h mit 6 µg/ml CpG stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen mit 1x PBS behandelt, die daraufhin keine Stimulierung der dendritischen Zellen zeigten.

Ebenso konnten dendritische Zellen aus einer akuten bzw. chronischen Colitis gewonnen werden. Bei der chronischen Colitis wurden den Mäusen im Wechsel für eine Woche DSS (Dextran Sodium Sulfat) und für eine Woche normales Trinkwasser verabreicht. Dieser Zyklus wurde viermal wiederholt. Anschließend wurden die Mäuse betäubt, das Colon entfernt und dendritische Zellen wie bereits bei der Knochenmark-Gewinnung weiterbehandelt. Um Zellen aus einer akuten Colitis gewinnen zu können, wurde Mäusen DSS für die Dauer von einer Woche verabreicht und anschließend das Colon entnommen. Auch hier wurden die dendritischen Zellen wie bei den beiden vorhergehenden Fällen gewonnen.

Von diesen dendritischen Zellen wurde nun entsprechend dem Protokoll des NucleoSpin[®] tissue kit RNA präpariert.

E. Präparation von Milz und Thymus

Benötigte man Milz und Thymus von konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen, wurden neugeborene Mäuse durch Dekapitation getötet und eine sofortige Entnahme der benötigten Organe vollzogen. Diese Organe wurden daraufhin in flüssigen Stickstoff überführt, schockgefroren und anschließend für eine RNA-Präparation verwendet. Als Kontrolltiere wurden neugeborene Wildtyp-Mäuse ausgewählt, mit denen ebenso verfahren wurde.

Ebenso wurden Milz und Thymus von erwachsenen Tieren (~3 Monate) entnommen, wobei wegen der postnatalen Letalität von *Lmx1b*-Knockout Mäusen nur konventionelle *Lmx1b*^(+/-)-Mäuse

für die Präparation verwendet werden konnten. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse gleichen Alters. Diese Mäuse wurden zunächst mit Narcoren betäubt, dann die jeweiligen Organe entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für eine RNA-Präparation verwendet.

2.2.24 Mikroarray

Um potentielle Zielgene von *Lmx1b* ausfindig machen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit dem Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik ein Mikroarray mit dem „Agilent Genchip“ durchgeführt. Hierfür wurde RNA der Nieren, der vorderen Gliedmaßen, der Augen und der Leber von konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen präpariert (s.a. 2.2.16 F) und ihre Qualität (s.a. 2.2.9 C) kontrolliert. Da *Lmx1b* in der Leber nicht exprimiert wird, dient dieser Ansatz als Kontrolle. Es wurden jeweils 3 Mäuse pro Ansatz verwendet, wobei *Lmx1b*^(+/+)-Mäuse mit *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen verglichen wurden. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms „Microsoft Excel“.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung induzierbarer Podozyten-spezifischer *Lmx1b*-Knockout Mäuse

Bisherige Studien an konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen haben gezeigt, dass diese einen gravierenden Schaden der glomerulären Filtrationsbarriere aufweisen und somit ein nützliches System für die Erforschung der autosomal dominant vererbten Erbkrankheit „Nagel-Patella-Syndrom“ darstellen. Allerdings weisen diese konventionellen Knockout Tiere auch einige Gegensätze zum typischen Krankheitsverlauf bei Patienten auf, wie z. B. eine unterschiedliche Expression von wichtigen Nieren-spezifischen Genen. Ebenso zeigen die konventionellen Knockout Tiere eine massivere Ausprägung des Krankheitsmusters, während heterozygote Tiere, im Gegensatz zum dominanten Verlauf bei Patienten, phänotypisch gesund sind. Ferner sterben konventionelle Knockout Mäuse innerhalb von 24 Stunden aufgrund ihrer Schwere an Erkrankungen und können somit nicht für weitere Studien und Untersuchungen dienen. Eine Weiterentwicklung war die Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Maus, die wiederum erhebliche Schäden an der Filtrationsbarriere zeigte, diesmal aber bis zu 2 Wochen überlebte. Hier konnte man feststellen, dass primäre Podozytenfortsätze gebildet wurden, sekundär aber wieder verloren gingen. Eine weitreichendere Analyse der Rolle von *Lmx1b* in erwachsenen Mäusen war aber leider auch hier nicht möglich.

Deshalb war es von entscheidender Bedeutung, ein geeignetes System zur Erforschung des Nagel-Patella-Syndroms zu kreieren, um die Rolle von *Lmx1b* in der erwachsenen Niere zu untersuchen. Hierfür war die Entwicklung von induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen, bei denen man *Lmx1b* zur gewünschten Zeit ausschalten konnte, sehr hilfreich.

3.1.1 Generierung von induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen

Um induzierbare Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Mäuse zu erhalten, mussten zunächst drei verschiedene Mauslinien miteinander gekreuzt werden: *Lmx1b*^{lox/+}, LC-1 und P2.5-rtTA. Die *Lmx1b*^{lox/+}-Linie besitzt ein gefloxtes *Lmx1b*-Allel, wobei die Exone 4 bis 6 von loxP-Seiten

flankiert und somit herausgeschnitten werden können. Während LC-1 einen Tetrazyklin-abhängigen Promotor, der die Transkription von Cre kontrolliert, besitzt, beinhaltet P2.5-rtTA einen Tetrazyklin-Transaktivator unter der Kontrolle des Podocin Promoters.

Zunächst wurden die *Lmx1b*-geflochten Mäuse mit P2.5-rtTA Mäusen verpaart, was zu einer doppelt-transgenen Linie *Lmx1b*^{lox/+}; P2.5-rtTA führte. Ebenso wurden *Lmx1b*-geflochte Mäuse mit LC-1 Mäusen verpaart, was zur neuen doppelt-transgenen Linie *Lmx1b*^{lox/+}; LC-1 führte. Kreuzte man nun diese beiden Linien untereinander, resultierte dies in der dreifach-transgenen Linie *Lmx1b*^{lox/lox}; P2.5-rtTA; LC-1 (fortan auch nur kurz: lox/lox; rtTA; Cre bezeichnet). Diese Mäuse waren phänotypisch unauffällig und erreichten ein normales Lebensalter von bis zu 2 Jahren. Für die durchgeführten Studien wurden adulte Mäuse beiderlei Geschlechts mit einem Alter von 3-6 Monaten verwendet. Die jeweiligen Genotypen wurden mittels PCR bzw. Southern Blot verifiziert (s.a. 2.2.14).

Für die Kontrolle der erfolgreichen Rekombination und somit einer Inaktivierung von *Lmx1b* wurde genomische DNA aus Mäusenieren gewonnen, diese mittels *Lmx1b*-spezifischer PCR vermehrt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Fand keine Rekombination statt, wurde nur eine Bande auf Höhe von ~2,3 kb erwartet, was auch in den Fällen der doppelt-transgenen Mäusen „lox/lox; rtTA“ (s.a. Abb. 6: Banden auf Höhe Pfeilkopf) oder dreifach-transgenen Mäuse ohne Doxyzyklin-Gabe (s.a. Abb. 6, Spur C) bestätigt werden konnte. Durch die Kontrolle der dreifach-transgenen Mäuse ohne Doxyzyklin konnte eine einwandfreie Funktionalität des Systems bewiesen werden. Wurde allerdings dreifach-transgenen Mäusen 2 mg/ml Doxyzyklin mit 5% Sucrose ins Trinkwasser verabreicht, wurde der Knockout induziert: es fand eine Rekombination innerhalb von *Lmx1b* und somit dessen Inaktivierung statt, was durch eine nun verkürzte DNA-Länge auf ~0,6 kb nachgewiesen werden konnte (s.a. Abb. 6: Banden auf Höhe Pfeil). Das Ereignis der Rekombination konnte bereits nach einer Woche mit Doxyzyklin-Behandlung gezeigt werden, wobei allerdings die Bandenstärke der rekombinierten DNA bei Mäusen mit zwei oder vier Wochen Doxyzyklin-Gabe schwächer war als im Vergleich zu den Tieren mit nur einer Woche Doxyzyklin-Behandlung. Dies ist wohl auf einen hohen Verlust von Podozyten nach dieser Zeit zurückzuführen (s.a. Abb. 6: Banden auf Höhe Pfeil).

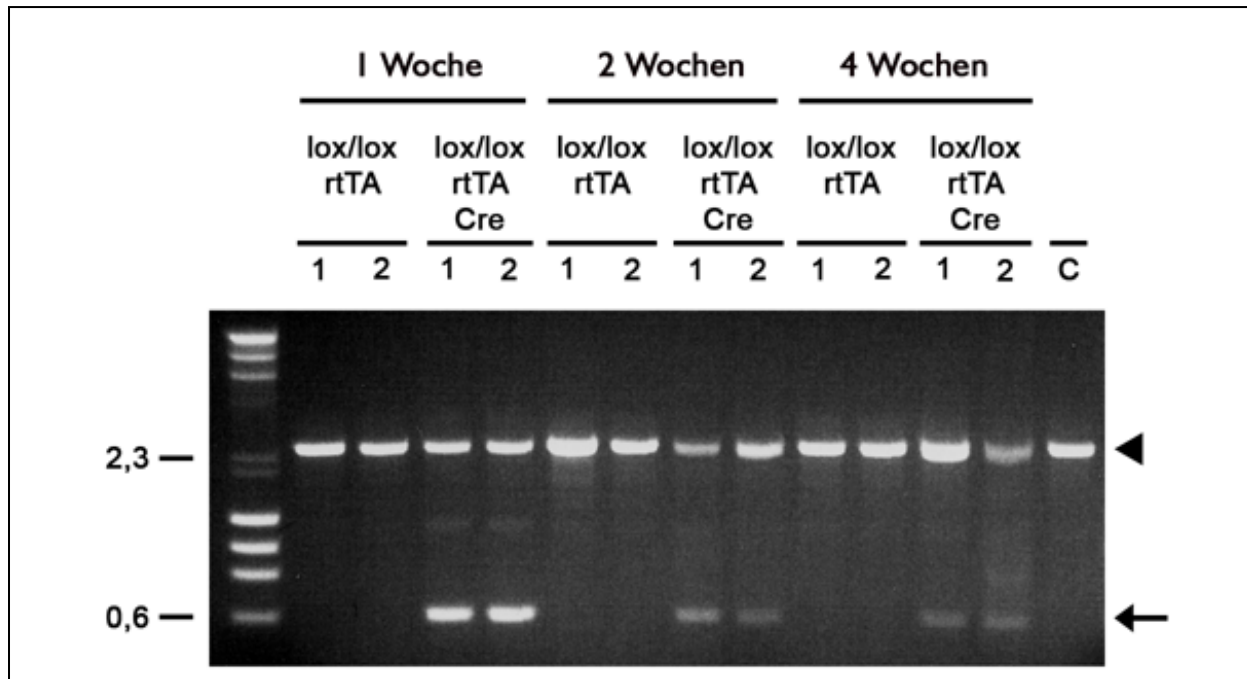


Abb. 6: Nachweis zur Inaktivierung von *Lmx1b*. Ist *Lmx1b* intakt, kann eine Bande auf der Höhe von ~2,3 kb detektiert werden (siehe Pfeilkopf); fand hingegen eine erfolgreiche Rekombination bei dreifach-transgenen Mäusen (lox/lox; rtTA; Cre) statt, wurde *Lmx1b* verkürzt und bildet nun ein DNA-Stück mit ~0,6 kb Länge (siehe Pfeil). Bei zweifach-transgenen Mäusen (lox/lox; rtTA) oder einer Kontrolle von dreifach-transgenen Mäusen ohne Doxyzyklin-Gabe (Spur C) konnte keine Rekombination festgestellt werden.

3.1.2 Mäuse mit induzierbarem Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout entwickeln eine Proteinurie

Induzierbare Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Mäuse wurden, wie bereits beschrieben, durch gemischte Kreuzungen der Maus-Linien *Lmx1b*^{lox/+}, P2.5-rtTA und LC-1 erhalten. Um nun in Erfahrung zu bringen, ob dreifach-transgene Mäuse ein funktionales System stellen und wann das erste Auftreten einer Proteinurie nach Induktion in Erscheinung tritt, wurden mehrere Ansätze mit induzierten Mäusen verwendet, von denen alle zwei Tage der über 24 h abgegebene Urin in Stoffwechselkäfigen gesammelt wurde. 0,2 µl des jeweiligen Urins wurde daraufhin mittels eines Bradford-Assays auf darin enthaltene Proteine untersucht und hiervon eine Zeitkurve erstellt. Hier war festzustellen, dass induzierbare Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Mäuse eine heftige Proteinurie ab Tag 7 nach Induktion entwickelten, während zweifach-transgene Mäuse ohne funktionierendes System keine Proteinurie bildeten (s.a. Abb. 7).

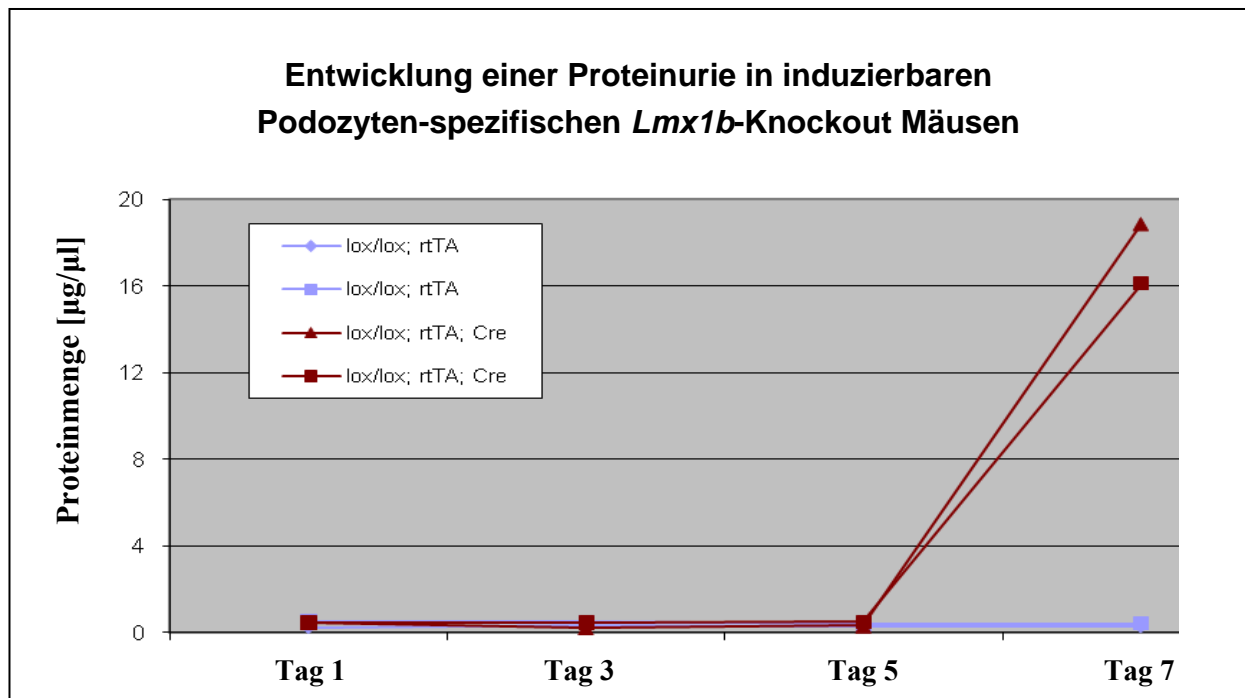


Abb. 7: Früheste Entwicklung einer Proteinurie. Dreifach-transgenen *Lmx1b*-Knockout Mäusen (*lox/lox; rtTA; Cre*) wurde 2 mg/ml Doxyzyklin mit 5% Sucrose verabreicht und jeweils im 2-Tages-Rhythmus 24 h-Urin in Stoffwechselkäfigen gesammelt. Nach Messung der im Urin enthaltenen Proteine konnte gezeigt werden, dass sich eine Proteinurie nach 7 Tagen entwickelt hatte und somit als der früheste Zeitpunkt der Bildung einer Proteinurie anzusehen ist. Doppelt-transgene Mäuse (*lox/lox; rtTA*), welchen ebenso Doxyzyklin verabreicht wurde, entwickelten keine Proteinurie und dienten als Kontrolle.

Um den Verlauf der Proteinurie weiter erfassen zu können, wurde dreifach-transgenen Mäusen (*Lmx1b*^{*lox/lox*}; *rtTA; Cre*) Trinkwasser mit 2 mg/ml Doxyzyklin mit 5% Sucrose über die Dauer von einer Woche, zwei Wochen oder vier Wochen gegeben und jeweils zu diesen Zeitpunkten der 24 h-Urin gesammelt und dieser auf Proteinurie untersucht. Ebenso wurde mit zweifach-transgenen Mäusen verfahren, welche als Kontrolltiere dienten. Für den Nachweis von Proteinen wurde ein Bradford-Assay durchgeführt, wobei 0,2 µl einer Urinprobe mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt wurden und anschließend die Proteinkonzentration gemessen wurde. Als Ergebnis konnte bei zweifach-transgenen Mäusen (*lox/lox; rtTA*) keine Bildung einer Proteinurie festgestellt werden, während dreifach-transgene Mäuse eine heftige Proteinurie nach einer Woche mit Doxyzyklin-Gabe bildeten und diese über den Zeitraum von vier Wochen auf einem hohen Wert behielten (s.a. Abb. 8).

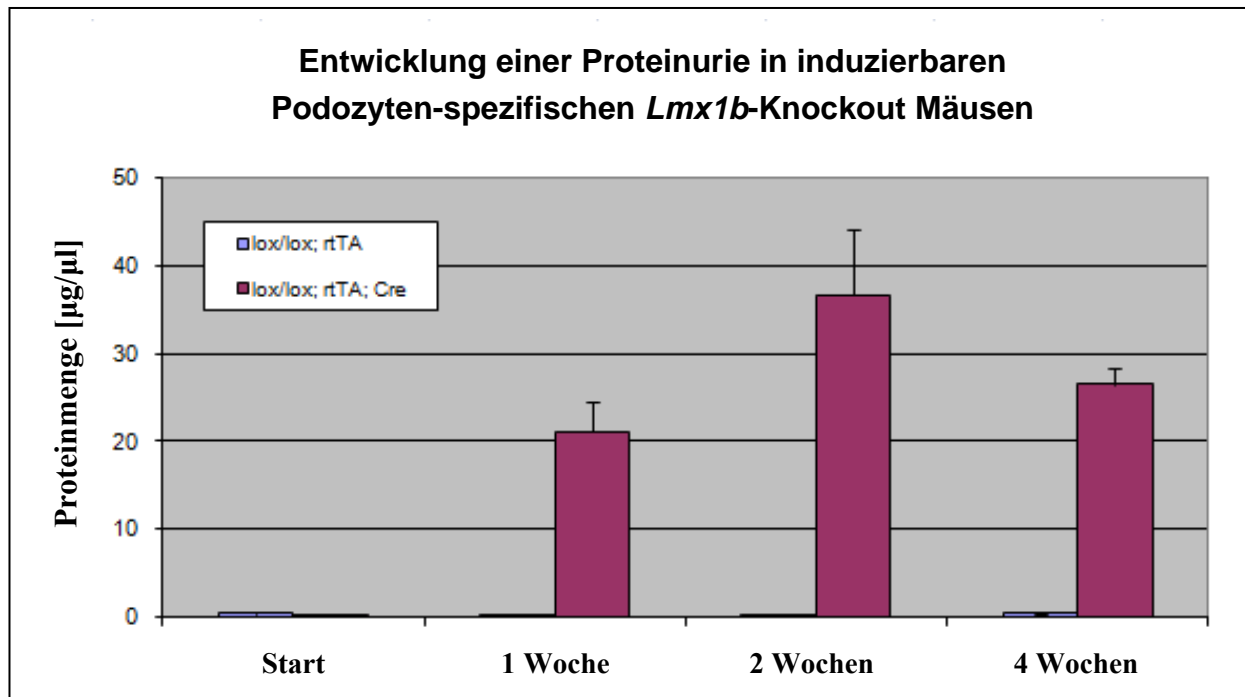


Abb. 8: Darstellung der Entwicklung einer Proteinurie in induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen. Dreifach-transgenen *Lmx1b*-Knockout Mäusen (lox/lox; rtTA, Cre) wurde über den Zeitraum von 1, 2 oder 4 Wochen Doxyzyklin ins Trinkwasser gegeben. Dies führte zu einer massiven Proteinurie bereits nach einer Woche, welche in ihrer Stärke über den Zeitraum von bis zu 4 Wochen noch leicht zunahm. Kontrollmäuse (lox/lox; rtTA), denen ebenso Doxyzyklin verabreicht wurde, entwickelten keine Proteinurie.

Um sowohl die Dichtheit des System als auch den Verlauf der Proteinurie zu verdeutlichen, wurden ebenso 0,2 µl Urin der oben genannten Versuchsmäuse auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, welches anschließend mit Coomassie gefärbt wurde (s.a. 2.2.8). Ein negatives Ergebnis und somit die Zuverlässigkeit des Systems konnte wiederum auf dem Proteingel bei mit normalen Trinkwasser behandelten dreifach-transgenen Mäusen nachgewiesen werden (s.a. Abb. 9, Spur C). Auch konnte gezeigt werden, dass doppelt-transgene Mäuse trotz Doxyzyklin-Gabe keine Proteinurie entwickelten (s.a. Abb. 9). Gab man allerdings dreifach-transgenen Mäusen (lox/lox; rtTA, Cre) 2 mg/ml Doxyzyklin mit 5% Sucrose ins Trinkwasser, wurde ein Knockout von *Lmx1b* induziert und Proteinurie konnte in Urinproben, die über 24 h in Stoffwechselkäfigen gesammelt wurden, festgestellt werden (s.a. Abb. 9). Eine Langzeitbeobachtung über ein halbes Jahr mit Doxyzyklin-Gabe zeigte, dass weder die Proteinurie an Stärke weiter zunahm noch dass die Proteinurie zum Tod der Maus führte. Längere Beobachtungen wurden hierüber nicht durchgeführt.

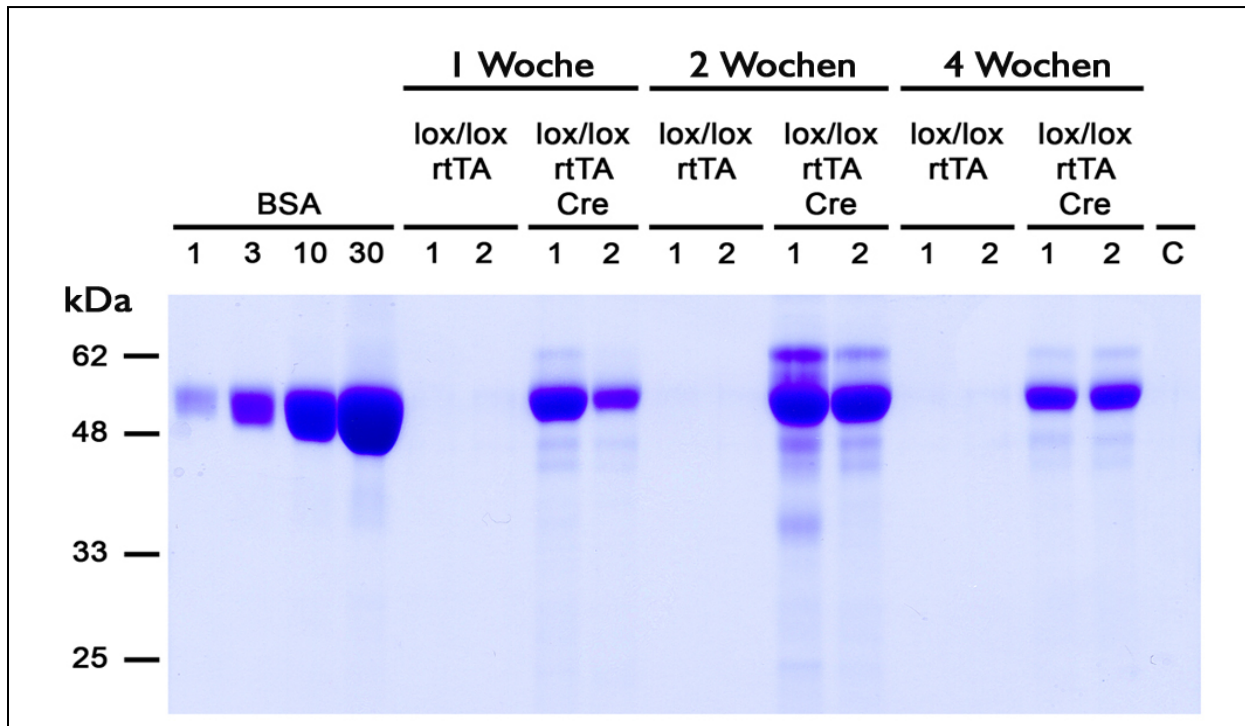


Abb. 9: Bildung einer Proteinurie in induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen. 0,2 µl Urin von mit bis zu 4 Wochen mit Doxyzyklin behandelten dreifach-transgenen Mäusen (lox/lox; rtTA; Cre) wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Diese zeigten bereits nach einer Woche eine heftige Proteinurie, während unbehandelte dreifach-transgene Mäuse (Spur C) keine Proteinurie entwickelten. Zweifach-transgene Mäuse (lox/lox; rtTA) besitzen kein funktionales System und entwickelten ebenso keine Proteinurie trotz Doxyzyklin-Behandlung [BSA-Konzentrationen: 1 µg, 3 µg, 10 µg, 30 µg].

3.1.3 Der Verlust von *Lmx1b* in adulten Mäusen führt zu morphologischen Veränderungen der Nierenstruktur: HE-Färbungen

Adulten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen wurden nach ein-, zwei- oder vierwöchiger Behandlung mit 2 mg/ml Doxyzyklin mit 5% Sucrose die Nieren entfernt, diese in Paraffin eingebettet und hiervon 7 µm dicke histologische Schnitte gefertigt. Diese wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt, um die Nierenstruktur gut darstellen zu können (s.a. 2.2.16 A). Hierbei konnte man bereits nach einer Woche mit Doxyzyklin-Behandlung einige wenige Ansammlungen von Proteinen in den Tubuli beobachten. Diese Ansammlungen traten, einhergehend mit einer Erweiterung der Tubuli, vermehrt nach 2 Wochen und sehr häufig nach 4 Wochen Doxyzyklin-Behandlung auf (s.a. Abb. 10). Während die Proteinurie bereits nach einer Woche sehr hoch ist, konnten in lichtmikroskopischen Aufnahmen noch keine größeren Veränderungen festgestellt werden. Als Kontrolle wurden wiederum doppelt-transgene Mäuse (lox/lox; rtTA) verwendet, denen ebenso Doxyzyklin verabreicht wurde. Betrachtete man den

histologischen Aufbau der Nierenschnitte in diesen Mäusen, konnten keine Veränderungen festgestellt werden.

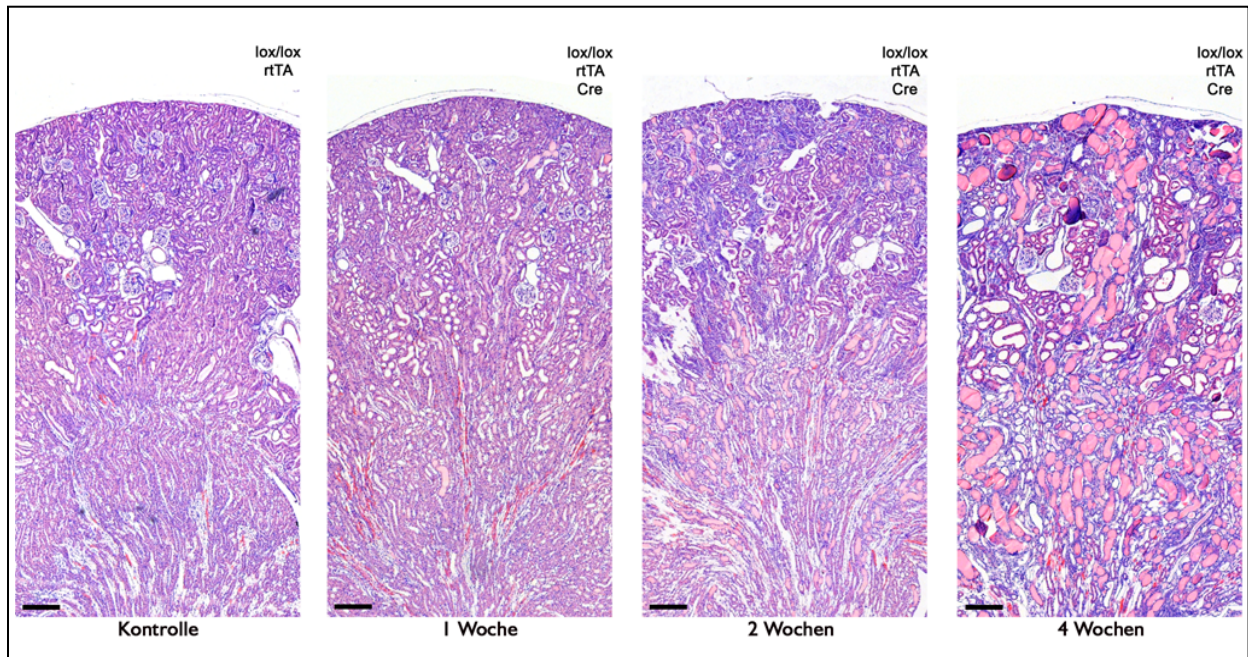


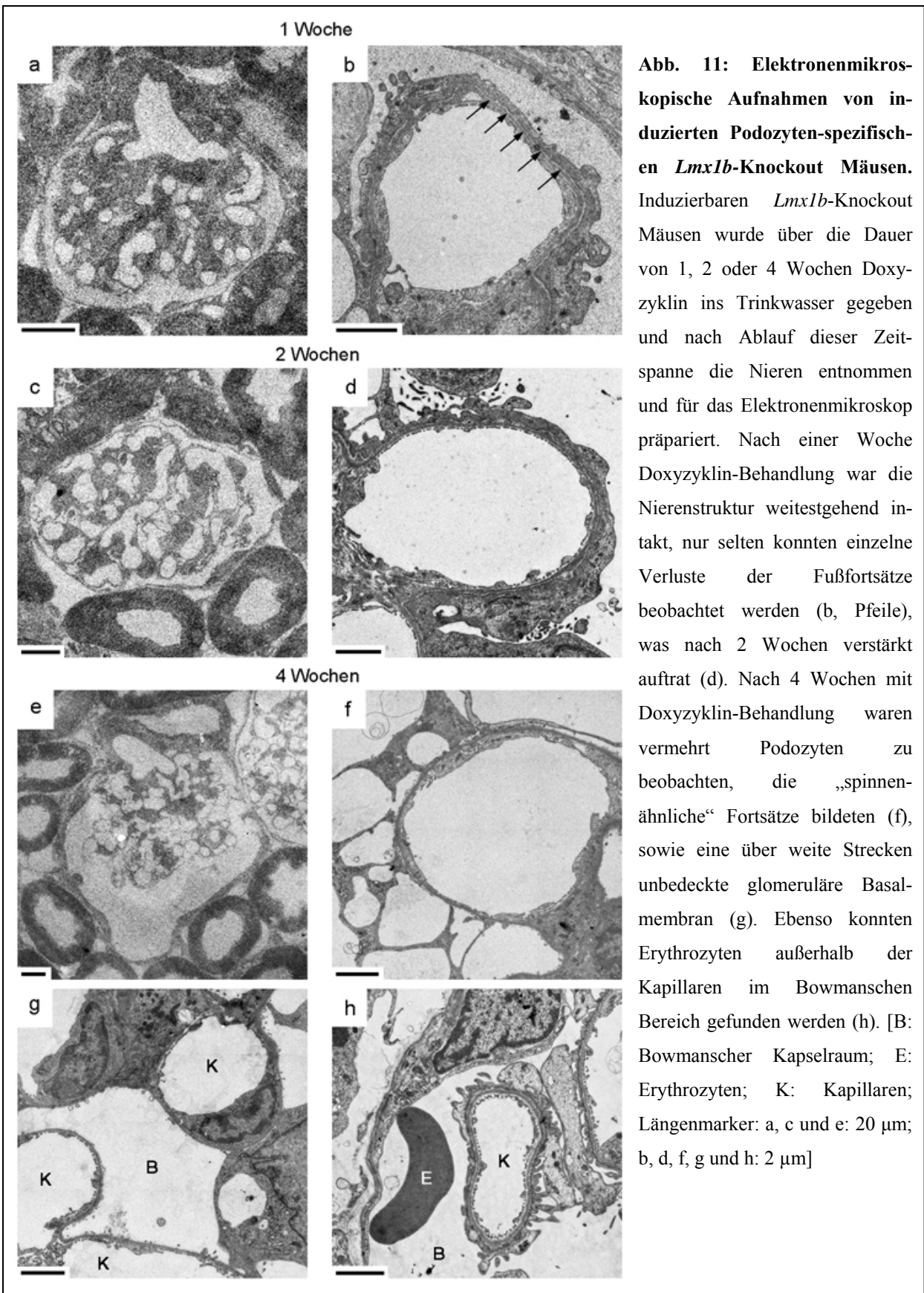
Abb. 10: Morphologische Veränderungen in lichtmikroskopischen Aufnahmen. Dreifach-transgenen *Lmx1b*-Knockout Mäusen (lox/lox; rtTA; Cre) wurde 2 mg/ml Doxyzyklin über den Zeitraum von 1, 2 oder 4 Wochen gegeben. Zu diesen Zeitpunkten wurden den Mäusen die Nieren entnommen, Schnitte angefertigt und mit HE gefärbt. Hierbei konnte man bei Mäusen mit einer Woche Doxyzyklin-Behandlung noch keine gravierenden Veränderungen in der Struktur erkennen, während man nach 2 Wochen, und ganz deutlich nach 4 Wochen, Proteinansammlungen in den Tubuli finden konnte. Ebenso erschienen manche Glomeruli atrophiert und viele Tubuli stark erweitert. Als Kontrolle dienten doppelt-transgene Mäuse (lox/lox; rtTA), denen ebenso Doxyzyklin verabreicht wurde, welche aber keine erkennbaren Veränderungen im Lichtmikroskop zeigten [Längenmarker: 1 μ m].

3.1.4 Elektronenmikroskopische Analysen zeigen einen Verlust der Nierenstruktur nach Inaktivierung von *Lmx1b*

Da induzierbare *Lmx1b*-Knockout Mäuse nach einer Woche Doxyzyklin-Gabe schon eine heftige Proteinurie aufwiesen, diese aber im Lichtmikroskop noch keine schwerwiegenden Veränderungen zeigten, war es nun interessant, den ultrastrukturellen Aufbau der Niere zu betrachten. Um dies bewerkstelligen zu können, wurden von mit Doxyzyklin behandelten Mäusen Nierenpräparate für das Elektronenmikroskop gefertigt. Hierfür wurden die narkotisierten Versuchstiere mit 4% PFA perfundiert, von diesen die Nieren entnommen, in

Epon eingebettet und ultradünn geschnitten. Diese Schnitte wurden mit einem Elektronenmikroskop analysiert (s.a. 2.2.16 B).

Nach einer Woche mit Doxyzyklin-Gabe konnten nur geringe, minderschwere morphologische Veränderungen in der Niere gefunden werden, was aufgrund der Schwere der Proteinurie in dieser Zeit überraschend war. Es wurden nur kleine Bereiche mit einem Verlust der Podozyten-Fortsätze festgestellt. Betrachtete man allerdings den Verlauf über zwei oder gar vier Wochen mit Doxyzyklin-Gabe, konnten nun weite Bereiche ohne Podozyten mit einer unbedeckten glomerulären Basalmembran beobachtet werden. Die Glomeruli sahen verkümmert aus und teilweise konnten auch Erythrozyten innerhalb der Bowmanschen Kapsel gefunden werden, was auf eine „Löchrigkeit“ der Filtrationsbarriere vermuten lässt. Sehr oft formten die Podozyten auch spinnenähnliche Fortsätze aus, die ein langes und dünnes Erscheinungsbild hatten, was zuvor noch in keinem anderen Krankheitsverlauf beobachtet werden konnte (s.a. Abb. 11).



3.1.5 Immunhistologische Färbungen zeigen keinen Verlust von funktionell bedeutsamen Proteinen bei Auftreten einer Proteinurie

Eine mögliche Ursache für den Verlust von Podozyten kann auch in der Herabregulierung bestimmter funktionell bedeutsamer Proteine begründet sein. Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurden histologische Schnitte von dreifach-transgenen Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen angefertigt, denen für eine, zwei oder vier Wochen 2 mg/ml Doxyzyklin mit 5% Sucrose verabreicht wurde. Diese Schnitte wurden daraufhin mit Antikörpern für Proteine gefärbt, von denen man aus bisherigen Studien weiß, dass sie beim Krankheitsbild des Nagel-Patella-Syndroms betroffen sind (s.a. 2.2.11).

Vergleicht man die Antikörperfärbung der Glomeruli der zweifach-transgenen Kontrolltiere mit der Färbung der Glomeruli von dreifach-transgenen induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen erkennt man keine Veränderung für Nephtrin, Podocin, Wt1 oder Kollagen IV $\alpha 4$ nach einer Woche mit Doxyzyklin-Gabe (s.a. Abb. 12). Vergleicht man aber die Färbung bei Tieren mit zwei Wochen Doxyzyklin-Behandlung, kann man nur noch eine teilweise Färbung für Nephtrin, Podozin oder Wt1 feststellen. Bei vier Wochen mit Doxyzyklin behandelten Mäusen konnte nahezu keine Färbung mehr für diese Proteine detektiert werden, wobei allerdings in dieser Versuchsgruppe auch einzelne Glomeruli eine vollständige und somit intakte Färbung aufwiesen. Überraschenderweise bleibt die Färbung für Kollagen IV $\alpha 4$ unverändert bestehen (s.a. Abb. 12). Da die Proteinurie nach nur einer Woche mit Doxyzyklin-Behandlung einen sehr hohen Wert angenommen hatte, mehrere essentielle Strukturproteine aber noch keine Beeinträchtigung zu diesem Zeitpunkt zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass andere Gründe für die Bildung einer Proteinurie ursächlich sind.

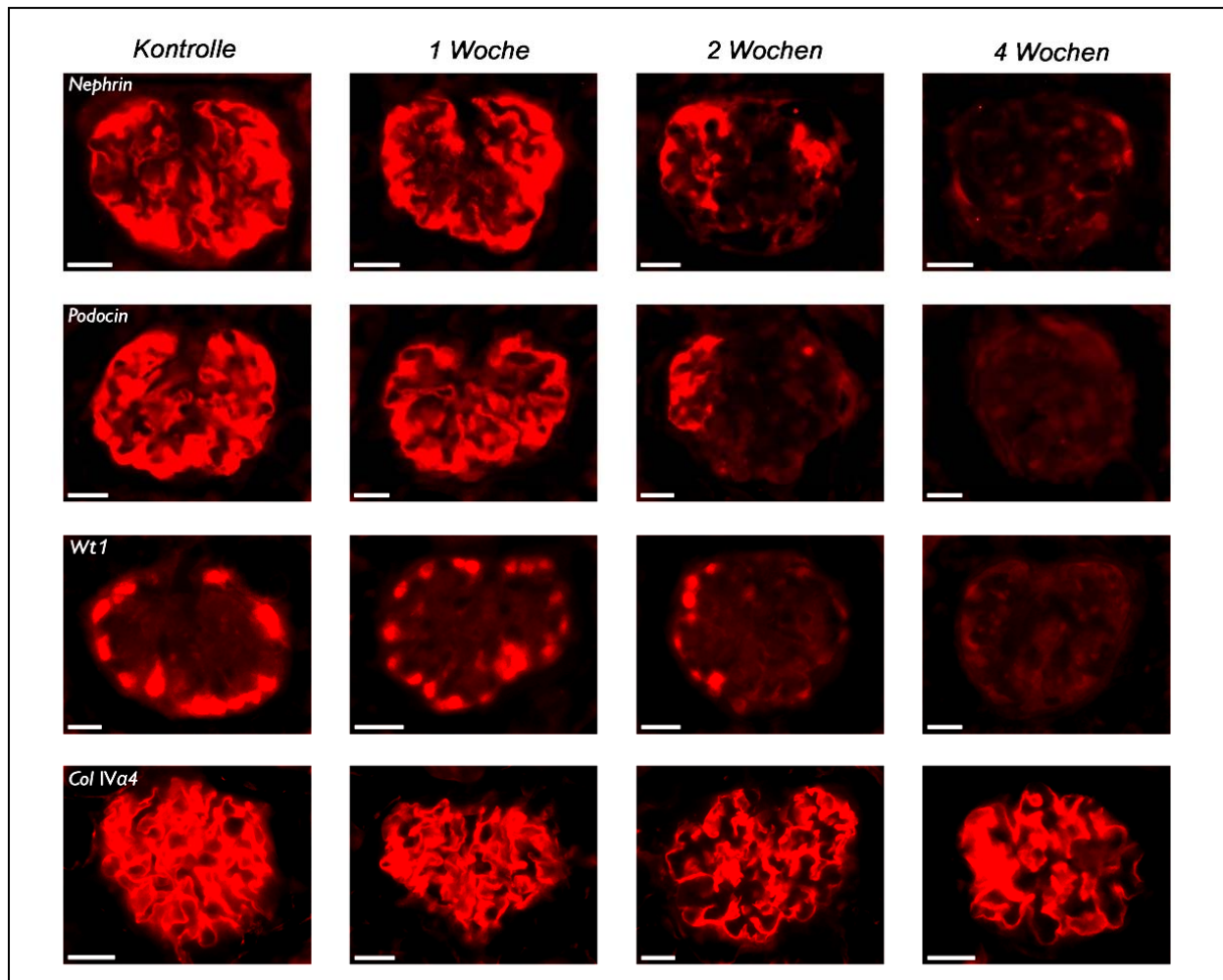


Abb. 12: Immunhistologische Färbungen von Glomeruli. Dreifach-transgenen *Lmx1b*-Knockout Mäusen wurde Doxyzyklin über einen Zeitraum von 1, 2 oder 4 Wochen verabreicht und nach dieser Zeit die Nieren entnommen. Schnitte dieser Nieren wurden mit Antikörpern gefärbt. Während man bei Nephrin, Podocin und Wt1 keine Veränderung nach einer Woche mit Doxyzyklin-Behandlung feststellen kann, verloren die Knockout Mäuse die Proteine im Verlauf von bis zu 4 Wochen mit Doxyzyklin-Gabe. Kollagen IV $\alpha 4$ war hingegen selbst in 4 Wochen mit Doxyzyklin behandelten Knockout Tieren nachweisbar. [Längenmarker: 20 μ m]

3.1.6 Induzierbare *Lmx1b*-Knockout Mäuse weisen keine Veränderung in der Ladungsdichte der glomerulären Basalmembran auf

Die glomeruläre Basalmembran trägt negative Ladungen, welche einen Einfluss auf die Durchlässigkeit von Molekülen hat. Ist diese Ladungsbarriere beschädigt, kann es zu einem Verlust bestimmter Moleküle kommen. Die nach der Inaktivierung von *Lmx1b* auftretende Proteinurie der Mäuse könnte somit auf eine Veränderung der Ladung entlang der glomerulären Basalmembran zurückzuführen sein. Diese Ladungsverteilungen entlang der Lamina rara externa

und Lamina rara interna kann man mittels einer Polyethylenimin-Färbung (PEI) sichtbar machen und sollte Aufschluss geben, ob hierin die Ursache für die Bildung einer heftigen Proteinurie nach nur einer Woche mit Doxyzyklin-Behandlung zu suchen ist.

Hierbei wurde den induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen bei Entwicklung einer Proteinurie, also nach einer Woche Doxyzyklin-Gabe, die Nieren entfernt, diese in kleine Würfel geschnitten und in eine Polyethylenimin-Lösung für eine Stunde gegeben. Anschließend wurden die Nieren-Stücke für elektronenmikroskopische Aufnahmen vorbereitet (s.a. 2.2.16 C). Betrachtete man nun die glomeruläre Basalmembran im Elektronenmikroskop, konnte man schwarze Punkte entlang der Basalmembran feststellen, die die negativen Ladungen darstellten. Vergleich man nun induzierte *Lmx1b*-Knockout Mäuse mit nicht-induzierten Mäusen, konnte bei Auszählungen dieser Punkte kein Unterschied in der Anzahl oder der Verteilung der negativen Ladungen festgestellt werden (s.a. Abb. 13). Die Ladungszusammensetzung der glomerulären Basalmembran ist somit intakt und kann nicht ursächlich für die Entwicklung einer Proteinurie sein.

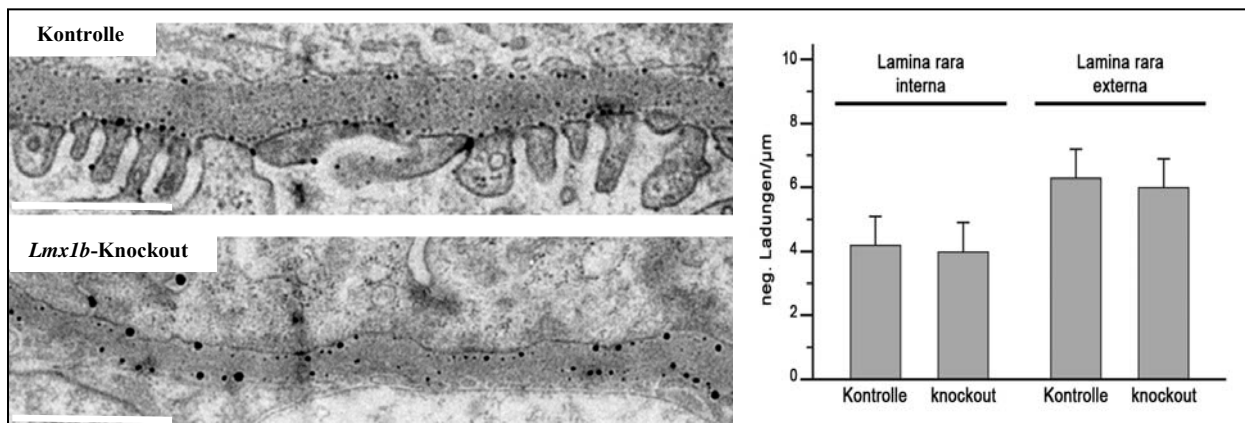


Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit PEI gefärbten Schnitten von induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen. Induzierbaren *Lmx1b*-Knockout Mäusen wurde für eine Woche Doxyzyklin verabreicht, welche daraufhin eine heftige Proteinurie entwickelten. Dann wurden die Nieren entnommen und mit Polyethylenimin behandelt, was zu einer Färbung von negativen Ladungen führte. Stellte man nun Kontrollmäuse den Knockout Mäusen gegenüber, konnte gezeigt werden, dass diese negativen Ladungen nach wie vor vorhanden und normal verteilt waren. Vergleich man die Anzahl an negativen Ladungen in der inneren bzw. äußeren Lamina rara konnte kein Unterschied zu den Kontrolltieren festgestellt werden. [Längenmarker: 1 μm].

3.1.7. Podozyten gehen aufgrund von Apoptose verloren

Um nun die Ursache für den Podozyten-Verlust aufdecken zu können, wurden verschiedene Assays zur Aufklärung herangezogen. Einer hierfür war der sog. „TUNEL“-Assay, bei dem durch FITC markiertes dUTP freie Enden, wie sie bei Apoptose entstehen, markiert werden und somit als Nachweis für das Auftreten eines programmierten Zelltods dienen können. Hierfür wurden dreifach-transgene Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Mäuse verwendet (lox/lox; rtTA; Cre), denen über den Zeitraum von einer Woche 2 mg/ml Doxzyklin mit 5% Sucrose verabreicht wurde, um eine heftige Proteinurie auszulösen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden den Mäusen die Nieren entfernt, in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte gefertigt. Diese wurden daraufhin mit dem „TUNEL-Assay“ laut Protokoll gefärbt, um ein etwaiges Auftreten von Apoptose nachweisen zu können (s.a. 2.2.12). Als Kontrolle dienten zweifach-transgene Mäuse, denen ebenso Doxzyklin verabreicht wurde, welche allerdings keine Proteinurie entwickelten.

Färbte man hierbei Nierenschnitte von dreifach-transgenen Mäusen mit FITC-markiertem dUTP, konnten positive Signale in der Peripherie des Glomerulums lokalisiert werden (s.a. Abb. 14, obere Zeile, DIC/FITC), was das Auftreten von Apoptose bei Podozyten anzeigt. Kontrollfärbungen von zweifach-transgenen Mäusen zeigten keine Färbung für Apoptose (s.a. Abb. 14, untere Bildreihe).

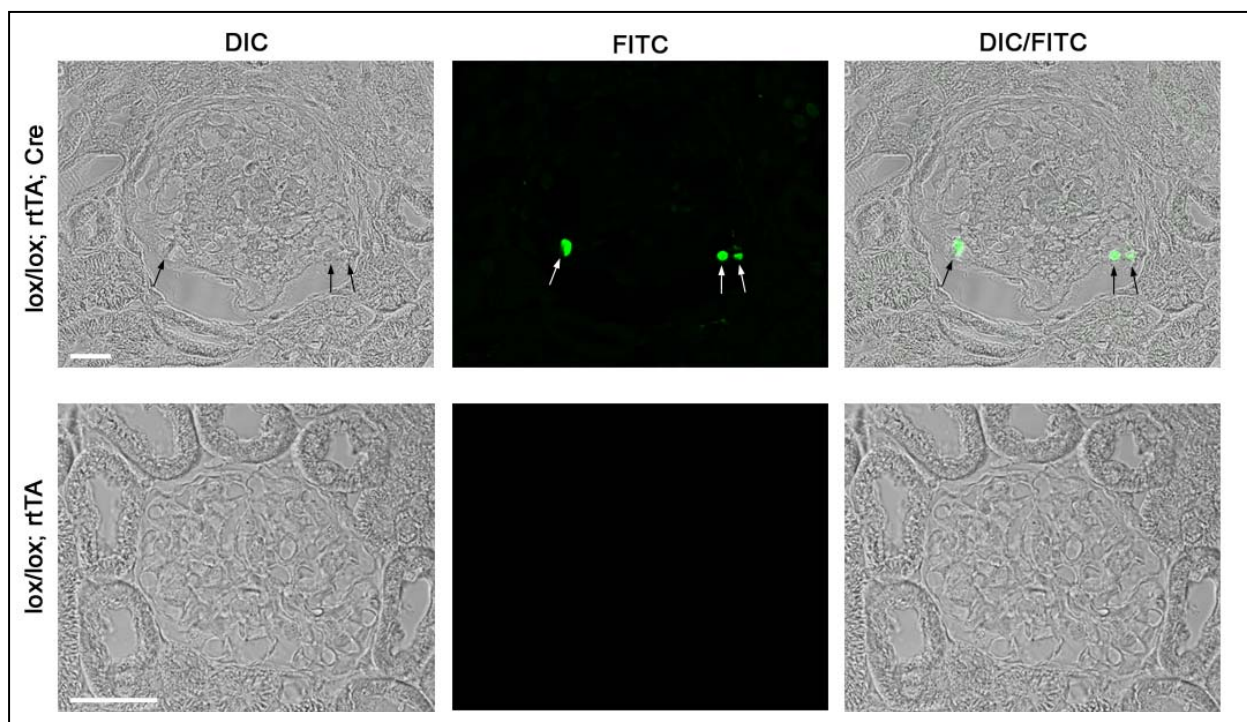


Abb. 14: Nachweis von Apoptose. Dreifach-transgenen *Lmx1b*-Knockout Mäusen wurde für eine Woche Doxyzyklin ins Trinkwasser gegeben und nach Auftreten der Proteinurie die Nieren entnommen. Schnitte dieser Nieren wurden mit dem sog. „TUNEL“-Kit zum Nachweis von Apoptose gefärbt. In induzierten *Lmx1b*-Knockout Tieren konnte ein positives Signal für Apoptose festgestellt werden (weiße Pfeile). Überlagerte man dieses Bild mit einer Durchlichtaufnahme, konnte diese Färbung der GBM aufgelagerten Zellen, den Podozyten, zugeordnet werden (obere Zeile, DIC/FITC-Aufnahme). Doppelt-transgene Mäuse zeigten kein positives Signal für Apoptose (untere Bildreihe). [DIC: Differentials Interferenz Kontrastbild; FITC: Fluorescein Isothiocyanat; Längenmarker: 20 µm bzw. 40µm]

3.1.8 Analyse von apoptotischen Genen

Um das Auftreten von Apoptose bei Podozyten nach Inaktivierung von *Lmx1b* genauer begründen zu können, wurde nach verschiedenen Apoptose-induzierenden Genen gesucht, die den programmierten Zelltod der Podozyten erklären könnten. Hierfür wurden zunächst die Daten eines DNA-Mikroarrays analysiert, welcher an konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen durchgeführt wurde (s.a. 4.3). Hierin konnten 15 Gene detektiert werden, durch deren Regulation der Eintritt von Apoptose begünstigt werden könnte (s.a. Tab. 10):

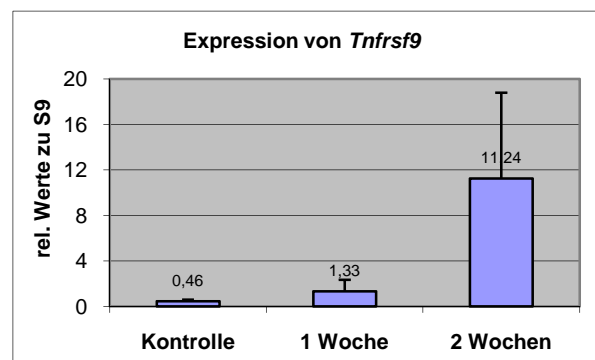
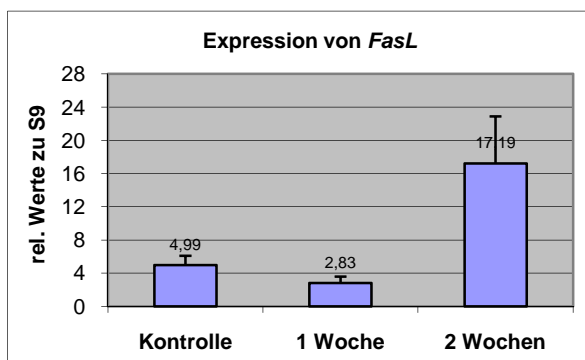
<i>Symbol</i>	<i>Name</i>	<i>Regulation in Knockout Mäusen</i>
Ankrd1	Ankyrin repeat domain 1	8,98x ↑
Arid4b	AT rich interactive domain 4B	2,39x ↑
Bcl2l1	Bcl2-like 11 (apoptosis facilitator)	2,03x ↑
Egf	Epidermal growth factor	2,80x ↓
Fas	TNF receptor superfamily, member 6	2,50x ↑
FasL	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	2,23x ↑
Ifi27	Interferon alpha-inducible protein 27	4,16x ↑
Lta	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	3,08x ↑
Muc4	Mucin 4	2,05x ↑
Oas1a	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A	3,16x ↑
Pmaip1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	3,05x ↑
Smpd3	Sphingomyelin phosphodiesterase 3	2,68x ↑
Tnfrsf9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	3,18x ↑
Unc13b	Unc-13 homolog B	2,70x ↑
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	2,13x ↓

Tab. 10: Aufstellung von apoptotischen Genen, die in konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen in der Niere signifikant reguliert wurden.

Von diesen Genen wurden einige charakteristische Gene für Apoptose ausgewählt und sollten nun mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf Proben von induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen getestet werden.

Hierbei wurden Nieren von Mäusen entnommen, die entweder für eine Woche bzw. zwei Wochen 2 mg/ml Doxyzyklin erhalten hatten, um einen Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout zu induzieren. Anschließend wurde von diesen Nieren die RNA präpariert, um diese für eine quantitative Echtzeit-PCR verwenden zu können. Durch die Verwendung von spezifischen Primern, die für Apoptose-induzierende Gene ausgesucht wurden, konnte man das Expressionsniveau des einzelnen untersuchten Gens feststellen.

Bei Auswertung der einzelnen Gene für Apoptose (in Zusammenarbeit mit Anne Rasclé) konnten drei Gene detektiert werden, die besonders hervorstachen: Während *FasL* erst nach 2 Wochen signifikant erhöhte Werte aufwies, zeigten *Tnfrsf9* und *Bcl2l1l* bereits nach einer Woche Induktion erhöhte Expressionsspiegel. Ferner stieg der Expressionsspiegel von *Tnfrsf9* noch weiter in Nieren von zwei Wochen induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen an (s.a. Abb. 15). Somit dient *Tnfrsf9* als vielversprechender Kandidat, die zu beobachtende Apoptose auf histologischen Schnitten erklären zu können. Ferner zeigte die Analyse des Expressionsspiegels von *Lmx1b* die Herabregulierung dieses Gens. Betrachtet man als früheste Ereignisse die Bildung einer Proteinurie bereits nach einer Woche und stellt sie der Beobachtung gegenüber, dass Podozyten aufgrund von Apoptose verloren gehen, kann man behaupten, dass ein besonderes Augenmerk auf die Gene *Tnfrsf9* und *Bcl2l1l* zu richten ist, welche allen Anschein nach von *Lmx1b* geregelt werden: direkt oder indirekt. Ebenso ist deutlich den Ergebnissen zu entnehmen, dass nach zwei Wochen der Induktion des Knockouts die Signalkaskade für Apoptose angeschaltet ist, da sowohl *FasL* als auch *Tnfrsf9* signifikant höher reguliert werden.



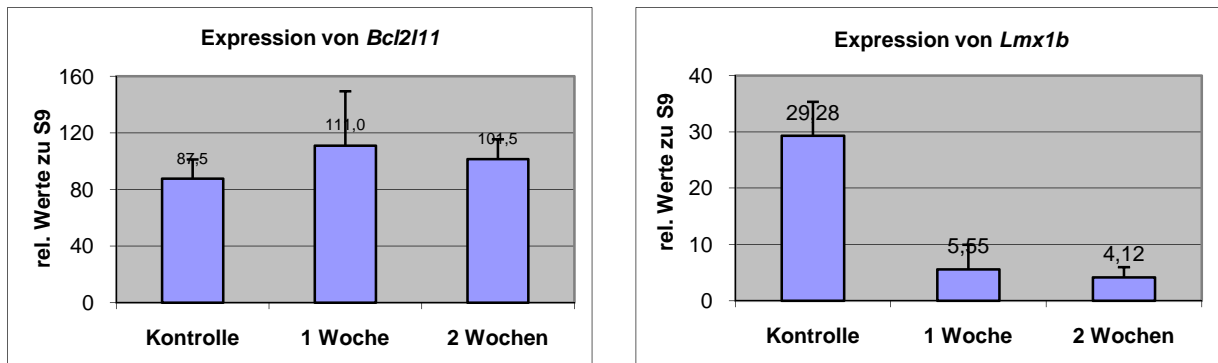


Abb. 15: Expressionsanalysen von Echtzeit-PCR Läufen. Von mit Doxyzyklin behandelten induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen wurden nach einer bzw. zwei Wochen die Nieren entnommen, hieraus RNA präpariert und für Echtzeit-PCR Läufe verwendet. Beim Test von verschiedenen apoptotischen Genen konnte eine Heraufregulierung von *FasL*, *Tnfrsf9* und *Bcl2l11* gemessen werden, was auf die Aktivierung der Signalkaskade für Apoptose rückschließen lässt. Als Kontrolle diente die Messung des Expressionsspiegels von *Lmx1b*, welcher wie zu erwarten herabreguliert wurde.

Die genauen Funktionen und Bedeutungen der einzelnen getesteten Gene für das Ereignis der Apoptose sollen nun näher dargestellt werden.

Tnfrsf9

Tnfrsf9 (synonym CD137, 4-1BB) ist ein Mitglied der TNF Rezeptor Familie und wird vorwiegend von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. Neben seiner Rolle als Regulator für die Proliferation von Lymphozyten konnten ebenso Ergebnisse erarbeitet werden, die eine Rolle als Auslöser von Apoptose nachwiesen. So untergingen Lymphozyten Apoptose, wenn sie mit CHO-Zellen kultiviert wurden, die *ILA* exprimierten, dem menschlichen Homolog zu *Tnfrsf9*. CHO-Zellen ohne *ILA*-Expression hingegen zeigten keine Apoptose [Schwarz et al., 1996]. Ebenso kann eine Aktivierung des TNF Rezeptors und der anschließenden Signalkaskade zur Lyse von Tumorzellen führen [Tamada & Chen, 2006]. Hinsichtlich der Funktion in Podozyten ist bisher nichts bekannt.

Bcl2l11

Bei *Bcl2l11* konnte gezeigt werden, dass es mit weiteren Mitgliedern der Bcl2-Familie interagiert und dadurch als Aktivator von Apoptose agieren kann. So zeigten neueste Daten von Chuang et al. 2011, dass eine Acetylierung und somit Aktivierung des Transkriptionsfaktors Foxo4 (forkhead box O4) die Expression von *Bcl2l11* steigert und zur Apoptose von Podozyten führt, wie es bei Patienten oder Mäusen mit diabetischer Nephropathie zu beobachten ist. Ebenso konnte in Granulosa-Zellen eine gestiegene Expression von *Bcl2l11* nach Überexpression von

Foxo3 (forkhead box O3) beobachtet werden, was wiederum zu Apoptose in diesen Zellen führte [Matsuda et al., 2011].

FasL

FasL dient als Ligand für den Fas-Rezeptor, bildet mit diesem einen Komplex und aktiviert ihn dadurch. So überrascht es einen nicht, dass, ähnlich wie *FasL*, auch *Fas* im Mikroarray von konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen höher exprimiert wurde. Bindet nun FasL an seinen Rezeptor, wird das Apoptose-auslösende Signal in die Zelle hineingetragen und verschiedene Zelltypen, v.a. Lymphozyten, unterlaufen über die Caspase-Signalkaskade den Prozess der Apoptose. Wie schon bei *Bcl2l1* konnte Matsuda et al. 2011 in den gleichen Versuchsansätzen auch eine gestiegene Expression von *FasL* beobachten, nachdem *Foxo3* in Granulosa-Zellen überexprimiert wurde. In der HIV-assoziierten Nephropathie kann es zu Apoptose in epithelialen Bereichen des Nephrons kommen. Studien hierzu an Podozytenkulturen von HIV-1 transgenen Mäusen zeigten entsprechend eine Heraufregulierung von *Fas/Fas* und *FasL/FasL* sowohl in der Echtzeit-PCR als auch im Western Blot. Da gezeigt wurde, dass NF-κB an den Promotor von *FasL* bindet, kann man annehmen, dass über NF-κB die Expression von FasL gesteigert wird, welches seinerseits Apoptose in den Podozyten auslösen kann [Ross et al., 2005].

3.2 Eigenschaften und Verhalten von *Lmx1b*/LMX1B-exprimierenden Zellen

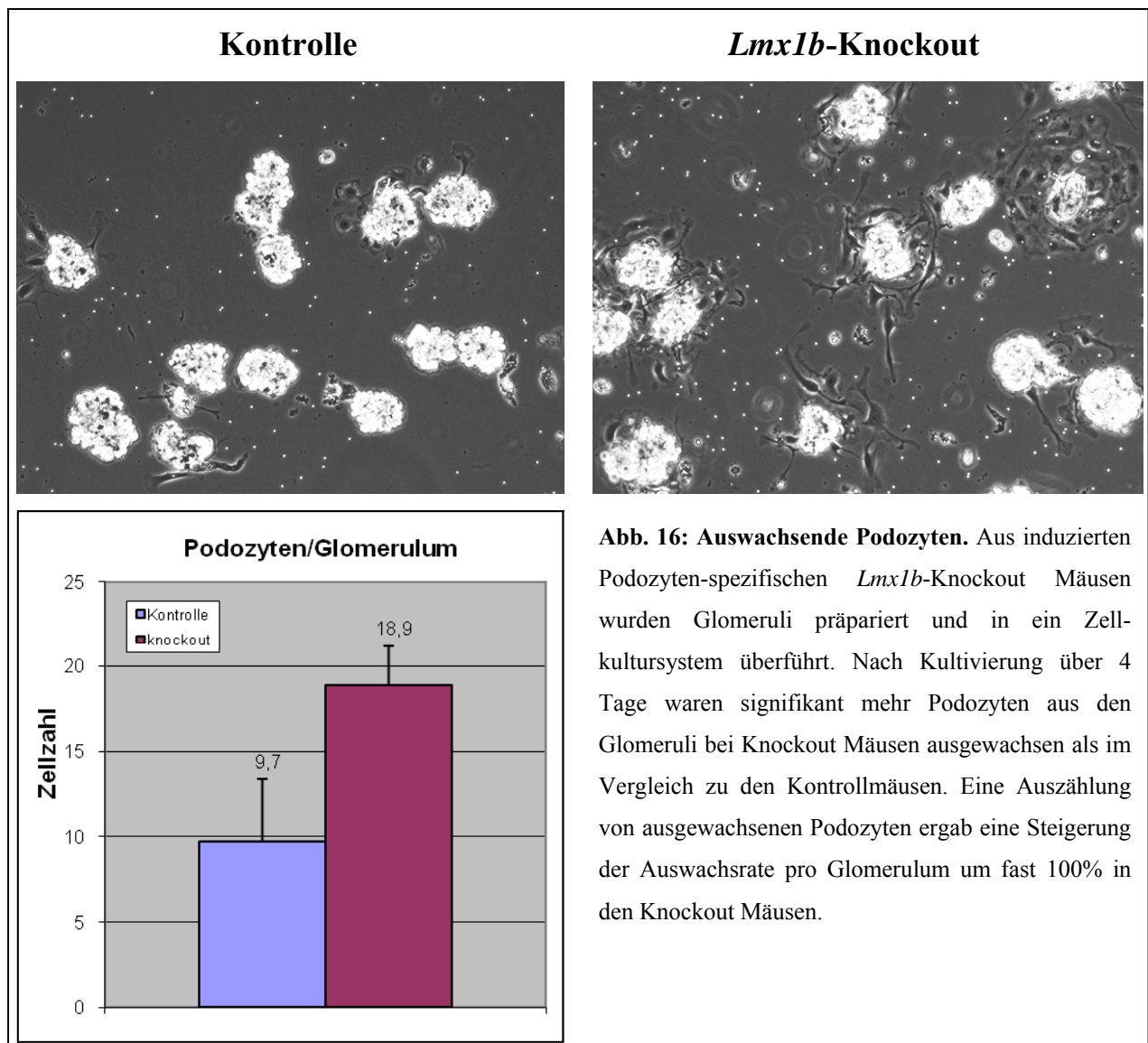
Da aus strukturellen Untersuchungen beobachtet werden konnte, dass nach einem Verlust von *Lmx1b* Podozyten ihre Struktur verlieren und die glomeruläre Basalmembran teils großflächig ohne Podozyten besetzt ist, wurde versucht, molekulare Ursachen hierfür aufzudecken. Dafür wurden zum einen LMX1B-exprimierende HeLa-Zellen verwendet und zum anderen primäre Podozyten aus Nieren von Knockout Mäusen gewonnen. Diese Zellen konnten nun als Grundlage für verschiedene Versuchsansätze dienen, wobei stets *Lmx1b*-exprimierende und nicht-exprimierende Zellen verglichen wurden

3.2.1 Podozyten mit induziertem Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout wachsen schneller aus Glomeruli aus

Da man beobachten konnte, dass nach Inaktivierung von *Lmx1b* in adulten Mäusen Podozyten verloren gingen, wurde zunächst der Kontakt der Podozyten zu der darunter liegenden glomerulären Basalmembran untersucht. Hierfür wurden Mäusen mit induziertem Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout die Nieren entnommen und aus diesen wiederum die Glomeruli präpariert (s.a. 2.2.18). Jene Glomeruli wurden in mit 10 µg/ml Fibronectin beschichteten Zellkultur-Schalen überführt, diese mit entsprechendem Medium aufgefüllt und über mehrere Tage das Auswachsen der Podozyten von den Glomeruli beobachtet. Parallel hierzu wurden Glomeruli aus Mäusen ohne *Lmx1b*-Knockout präpariert und als Kontrolle verwendet (s.a. 2.2.19).

Nach 4 Tagen Kultivierung konnte eine deutlich höhere Anzahl an ausgewachsenen Podozyten pro Glomerulum bei *Lmx1b*-Knockout Podozyten beobachtet werden (s.a. Abb. 15). Dieses Ergebnis ließ sich durch mehrmaliges Wiederholen der Versuchsansätze bestätigen. Das deutet auf eine schwächere Bindung der Podozyten an die glomeruläre Basalmembran hin und resultiert somit in einem schnelleren Auswachsen dieser Podozyten, sollte kein funktionsfähiges *Lmx1b* vorliegen. Zählte man die einzelnen Podozyten aus, die aus den jeweiligen Glomeruli ausgewachsen waren, konnte eine annähernd doppelt so hohe Rate an ausgewachsenen Podozyten pro Glomerulum bei Knockout Mäusen festgestellt werden als im Vergleich zu den Kontrollmäusen (s.a. Abb. 16). Es konnte somit gezeigt werden, dass ohne eine intakte *Lmx1b*-

Expression Podozyten eher den Kontakt zu ihrem Glomerulum verlieren und sich leichter vom Glomerulum trennen als mit *Lmx1b*-Expression.



3.2.2 Zellen mit LMX1B-Expression schließen langsamer eine künstlich verursachte Lücke

Nachdem festgestellt werden konnte, dass sich Podozyten ohne *Lmx1b*-Expression leichter von der glomerulären Basalmembran ablösen können als im Vergleich zu Podozyten mit *Lmx1b*-Expression, war es nun interessant, ob *Lmx1b* auch einen Einfluss auf die innere Struktur und Aufbau eines Podozyten hat. Da eine Podozyten-Zelllinie nur geringe Mengen *Lmx1b* exprimiert (Daten von Anne Rasche erhoben), wurden nun HeLa-Zellen verwendet (humane epitheliale

Zervixkarzinomzellen), die induzierbar LMX1B exprimieren konnten: durch Doxyzyklin-Gabe wurde eine Expression von LMX1B verhindert und bei Entfernung von Doxyzyklin die LMX1B-Expression ermöglicht (s.a. 2.2.4 C).

Es wurden zunächst HeLa-Zellen für 3 Tage mit (-Dox) bzw. ohne (+Dox) Induktion von LMX1B kultiviert; vorhergehende Arbeiten in HeLa-Zellen zeigten bereits, dass eine Induktion von LMX1B für 3 Tage in einer hohen Syntheserate von LMX1B resultiert. Nach Ablauf dieser 3 Tage wurden die jeweiligen Zellen trypsiniert und je 2×10^6 Zellen erneut in 6 cm-Petrischalen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag einen konfluenten Zellrasen bildeten; die Zellen wurden weiterhin mit Doxyzyklin bzw. ohne Doxyzyklin im Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurde in den Petrischalen ein 4 mm breiter Strich mit einem Metallspatel durch den Zellrasen gezogen, um die dort anhaftenden Zellen abzuschaben. Anschließend wurde zweimal mit Medium gewaschen, um nicht anhaftende Zellen aus dem Überstand zu entfernen. Von dieser freien Stelle wurden zu diesem Zeitpunkt Aufnahmen gemacht (d0) und die Zellen weiter im Brutschrank mit dem jeweils entsprechenden Medium inkubiert. An den folgenden Tagen wurden jeweils Aufnahmen von den gekratzten Stellen genommen und das Einwachsen der Zellen dokumentiert.

Bei Betrachtung des Spaltes und der Zellen über mehrere Tage konnte eindeutig festgestellt werden, dass Zellen ohne LMX1B-Expression schneller den Spalt wieder schließen als Zellen mit LMX1B-Expression (s.a. Abb. 17). Während ohne LMX1B-Expression die Lücke nach 2 Tagen geschlossen werden konnte, benötigten LMX1B-exprimierende Zellen mindestens 4 Tage zum Schließen der Lücke. Mehrfache Wiederholungen dieser Versuchsansätze führten zu denselben Ergebnissen.

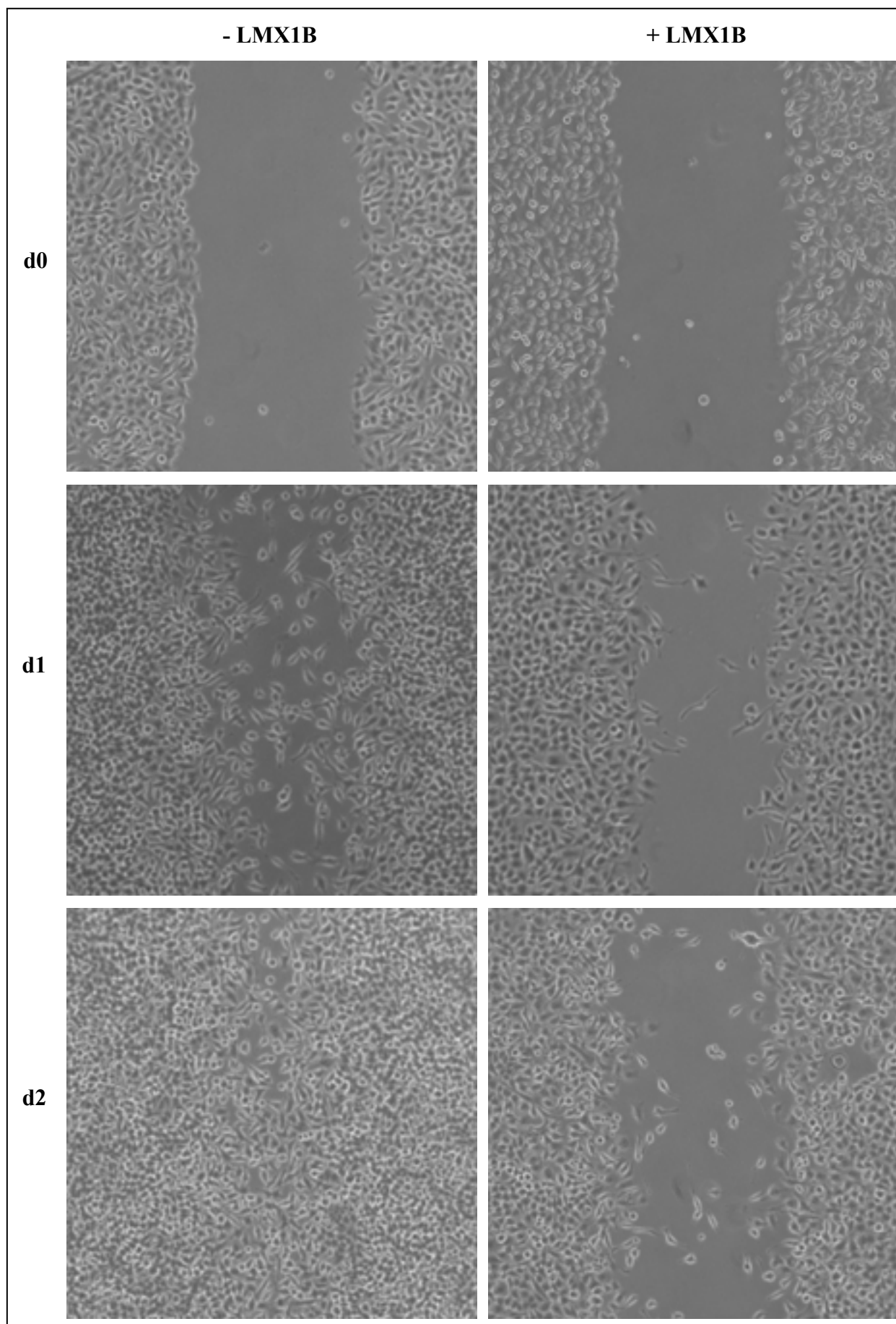
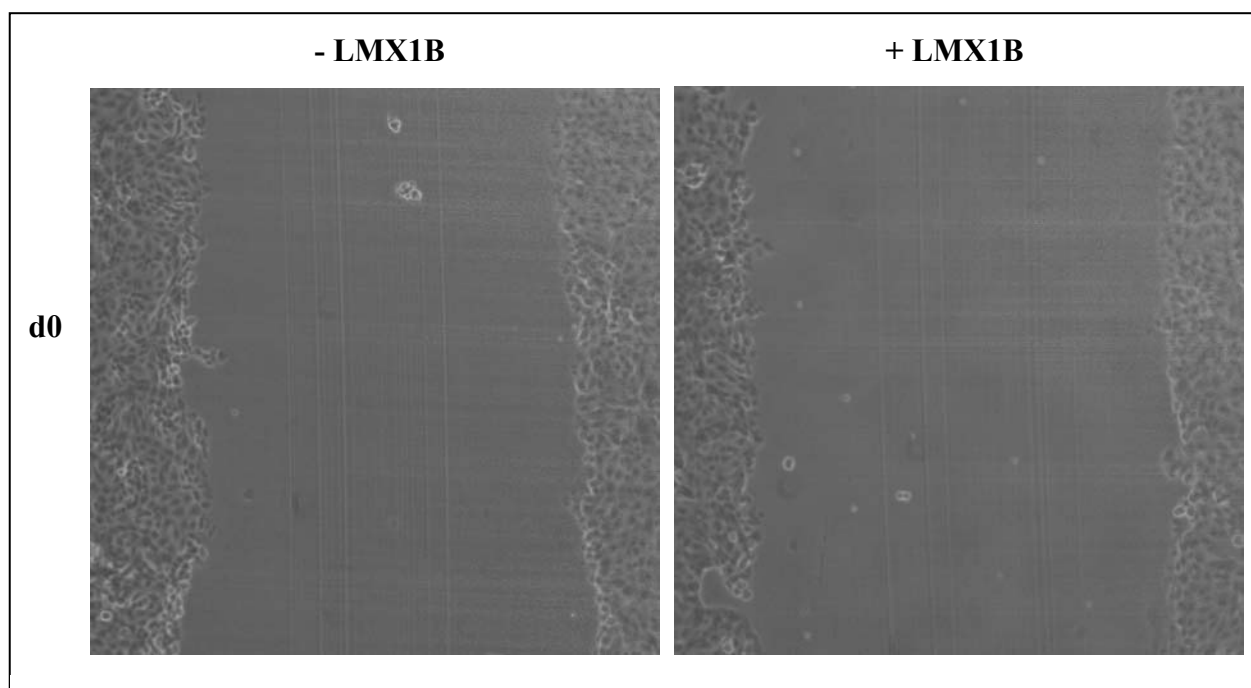


Abb. 17: Einwachsversuche in HeLa-Zellen. Ein 4 mm breiter Strich wurde in einen konfluenten Zellrasen von HeLa-Zellen gezogen, wodurch Zellen an dieser Stelle entfernt wurden. Während Zellen ohne LMX1B-Expression (+Dox) die Lücke bereits nach 2 Tagen wieder geschlossen hatten, waren Zellen mit LMX1B-Expression (-Dox) nicht in der Lage, diese Lücke in diesem Zeitraum zu schließen.

Um dieses Ergebnis nochmals zu bestätigen, so dass man einen Zelltyp-spezifischen Einfluss ausschließen konnte, wurde dieser Versuch ebenso mit LMX1B-exprimierenden LtTA-Zellen durchgeführt (Nierenepithelzellen aus dem Schwein). Auch hier konnte gezeigt werden, dass Zellen mit LMX1B-Expression ein langsames Einwachsen in die Lücke aufweisen als Zellen ohne LMX1B-Expression. Ohne LMX1B-Expression konnte die Lücke, wie schon bei HtTA-Zellen, bereits nach 2 Tagen geschlossen werden, während mit LMX1B-Expression der Schluss der Lücke erst nach etwa 4 Tagen erfolgte (s.a. Abb. 18). Mehrfache Wiederholungen dieser Versuchsansätze führten zu denselben Ergebnissen.



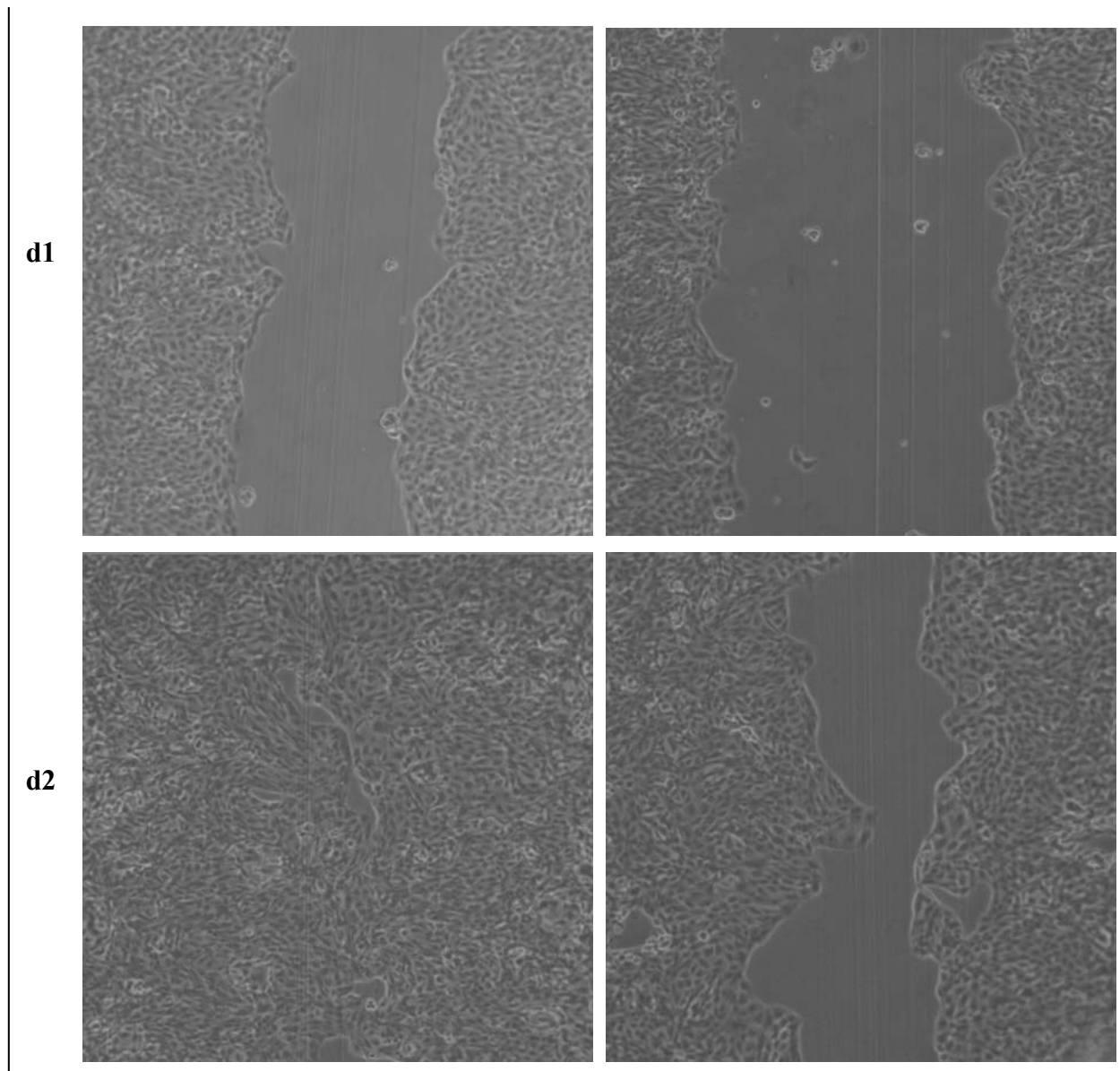


Abb. 18: Einwachsversuche in LtTA-Zellen. Wie zuvor bei HeLa-Zellen wurde auch hier in LtTA-Zellen ein 4 mm breiter Strich in einen konfluenten Zellrasen gezogen. Während Zellen ohne LMX1B-Expression (+Dox) die Lücke bereits nach 2 Tagen wieder schließen konnten, waren Zellen ohne LMX1B-Expression (-Dox) nicht in der Lage, die Lücke in dieser Zeit zu schließen.

Entsprechend den Auswachsversuchen von Podozyten aus Glomeruli, bei denen eine fehlende *Lmx1b*-Expression den Kontakt von Podozyten zu ihrem Glomerulum stören und diese somit leichter auswachsen können, konnten diese Ergebnisse bei den Einwachsversuchen von HeLa- und LtTA-Zellen bestätigt werden. Denn ohne LMX1B-Expression waren auch diese Zellen weniger stark an ihrer Oberfläche gehaftet und konnten somit den erzeugten Spalt wieder schneller bewachsen und mit einem Zellrasen bedecken als mit LMX1B-Expression.

3.2.3 Zellen mit LMX1B-Expression weisen eine geringere Zell-Motilität auf

Da man sehen konnte, dass Zellen, die LMX1B exprimieren, stärker an ihrer Oberfläche haften und langsamer eine künstlich verursachte Lücke schließen, wurde ein sog. Motilitätstest durchgeführt, der zeigen sollte, inwiefern einzelne Zellen eine Beeinträchtigung ihrer Beweglichkeit aufweisen. Hierfür wurden HeLa-Zellen zunächst für 3 Tage sowohl mit Doxyzyklin (keine LMX1B-Expression) als auch ohne Doxyzyklin (LMX1B-Expression) inkubiert. Danach wurden die Zellen trypsinisiert und 1×10^4 Zellen auf das Zentrum einer optischen Petrischale der Firma „ibidi“ ausgesät. Nach Anheftung der Zellen wurde fehlendes Medium mit bzw. ohne Doxyzyklin ergänzt und die Zellen für einen Tag im Inkubator weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen ein mit Hepes gepuffertes Medium ersetzt und die Kulturschale in ein Zeiss Mikroskop „Axiovert 200M“ mit einer 37°C Kammer eingelegt. Von nun an wurde über einen Zeitraum von 8 h minütlich ein Bild mit dem Programm MetaMorph 6.1 (Universal Imaging Corporation) aufgenommen, wodurch man nach Ablauf der 8 Stunden eine filmähnliche Sequenz erhielt. Mittels des Programms „ImageJ“ wurden die zurückgelegten Strecken der einzelnen Zellen in 8 h gemessen und dabei LMX1B-exprimierende Zellen mit nicht-exprimierenden Zellen verglichen (s.a. 2.2.6). Als Ergebnis ließ sich hierbei feststellen, dass Zellen, die LMX1B exprimieren, eine signifikant kürzere Strecke zurücklegten als ihre Kontrollzellen ohne LMX1B (s.a. Abb. 19). Dies stimmt wiederum mit den vorher gemachten Beobachtungen überein, was nun die Frage aufwirft, ob die geringere Motilität auf eine Fehlorganisation des Zytoskeletts im Inneren der Zelle beruht oder ob die Anheftung an das Substrat betroffen ist.

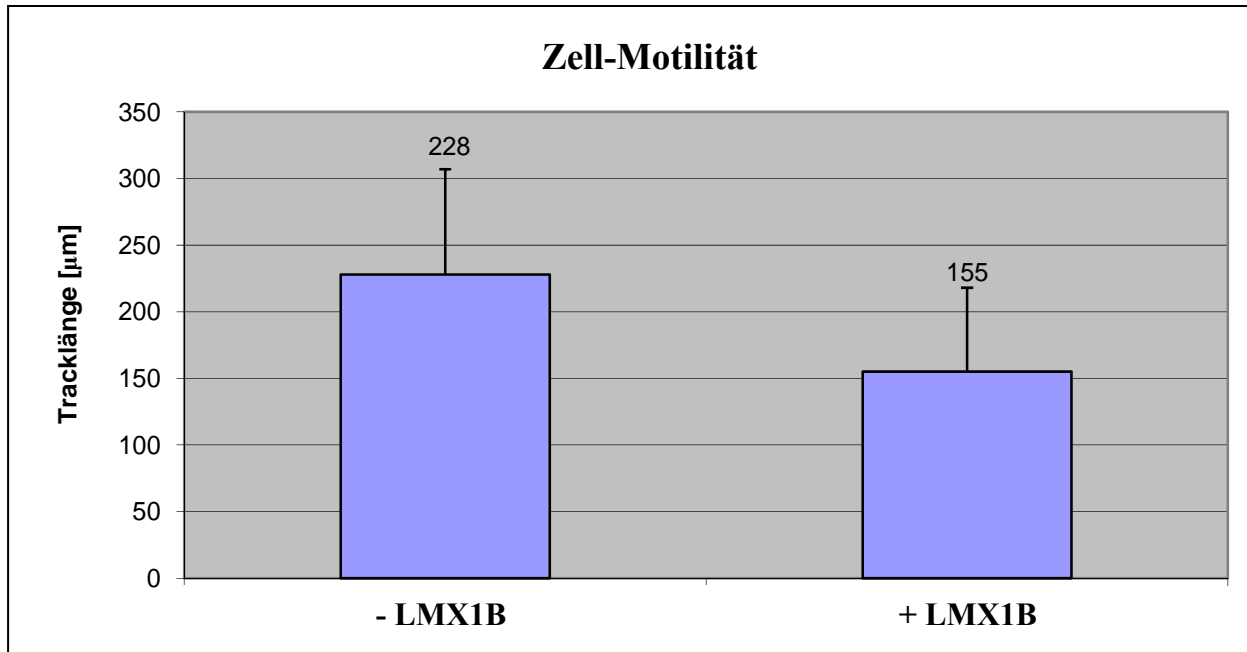


Abb. 19: Zell-Motilitäts-Test. HeLa-Zellen mit bzw. ohne LMX1B-Expression wurden in Kulturschalen mit optischem Boden ausgesät und minütlich Aufnahmen über einen Zeitraum von 8 h genommen. Nach Auswertung des Filmes konnten die zurückgelegten Strecken der Zellen gemessen werden. Hierbei wurde festgestellt, dass Zellen ohne LMX1B-Expression eine signifikant größere Strecke zurücklegen konnten als Zellen mit LMX1B-Expression.

3.2.4 LMX1B-exprimierende Zellen zeigen eine normale Färbung des Aktin-Zytoskeletts

Eine mögliche Ursache, die die verminderte Beweglichkeit bei LMX1B-Expression erklären könnte, wäre eine fehlerhafte Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Dadurch wären Zellen unbeweglicher und starrer und könnten sich so weniger an ihre Umgebung anpassen. Hierfür wurden zunächst Zellen mit bzw. ohne Doxyzyklin für 4 Tage kultiviert, um eine Expression von LMX1B zu ermöglichen (-Dox) bzw. zu unterdrücken (+Dox). Anschließend wurden die Zellen mit FITC-Phalloidin gefärbt, wodurch das Aktin-Zytoskelett deutlich grün gefärbt wurde. Nach einem Vergleich dieser beiden Ansätze konnte kein Unterschied sowohl in HeLa- als auch in LtTA-Zellen in der Aktin-Organisation festgestellt werden (s.a. Abb. 20). Eine fehlerhafte Organisation des Aktin-Zytoskeletts war somit nicht ersichtlich.

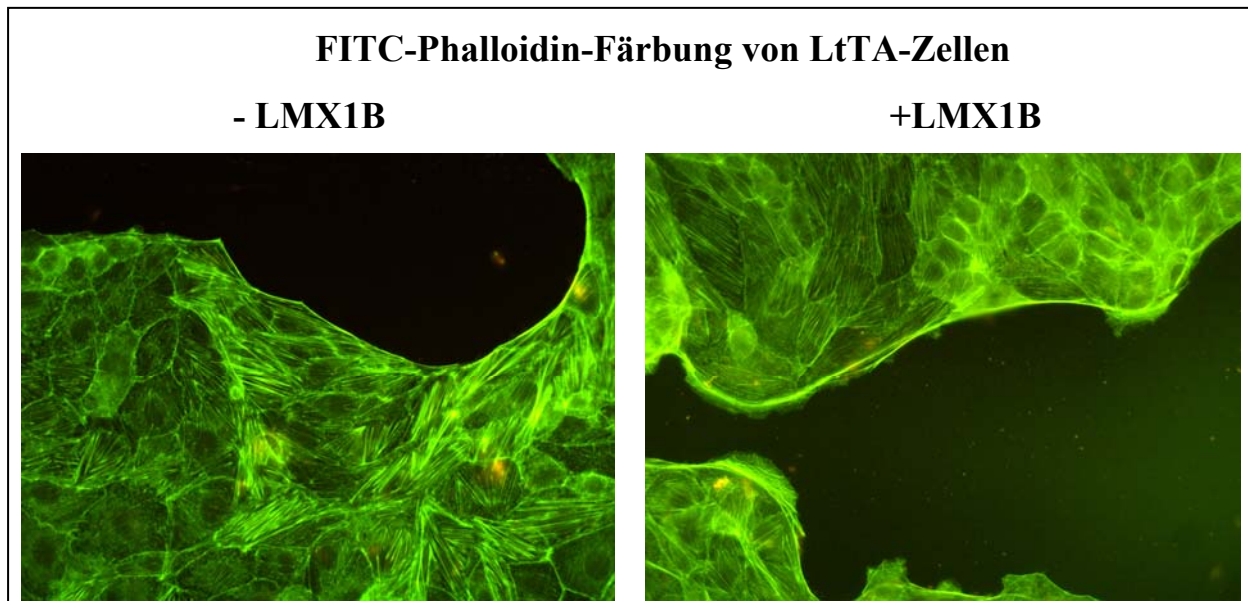


Abb. 20: FITC-Phalloidin-Färbung. LtTA-Zellen wurden für 4 Tage mit bzw. ohne Doxzyklin kultiviert, um die Expression von LMX1B zu unterdrücken bzw. zu ermöglichen. Eine anschließende Färbung der Zellen mit FITC-Phalloidin zeigte keinen Unterschied in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beider Zellansätze. Dieselben Ergebnisse konnten in HeLa-Zellen gemacht werden (hier nicht gezeigt).

3.2.5 Eine Beeinträchtigung von fibrillären oder globulären Aktin ist in LMX1B-exprimierenden Zellen nicht feststellbar

Eine weitere Möglichkeit Aktin näher zu untersuchen war, dass man globuläres bzw. fibrilläres Aktin miteinander verglich. Durch diese feinere Untersuchung des Aktins wurde versucht, eventuelle maskierende Effekte zu vermeiden und einen möglichen Unterschied zu verdeutlichen.

Hierfür wurden HeLa-Zellen zunächst für mehrere Ansätze aufgeteilt und ohne bzw. mit Doxzyklin weiterkultiviert. Nach Ablauf der jeweils gewünschten Zeitspanne von 2, 4 oder 6 Tagen Kultivierung wurden anschließend die Proteinlysate hieraus präpariert. Hierbei wurde allerdings nicht das Gesamtprotein gewonnen, sondern speziell die Lysate nach fibrillärem und globulärem Aktin getrennt (s.a. 2.2.4 F.). Nach Auftragen der jeweiligen Lysate auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und diese anschließend mit einem Aktin-spezifischen Antikörper gefärbt (s.a. 2.2.8). Die Darstellung des Aktins im Western Blot brachte keine Unterschiede sowohl bei globulären als auch bei fibrillären Aktin beim Vergleich von LMX1B-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen zu Tage (s.a. Abb. 21).

Zur Kontrolle wurde ebenso mit einem LMX1B-Antikörper gefärbt, der nur in Präparationen von Zellen ohne Doxyzyklin ein positives Signal wiedergab. Zusammenfassend mit dem Ergebnis der Färbung des Aktin-Zytoskeletts kann von keiner Beeinträchtigung der Organisation von Aktin ausgegangen werden.

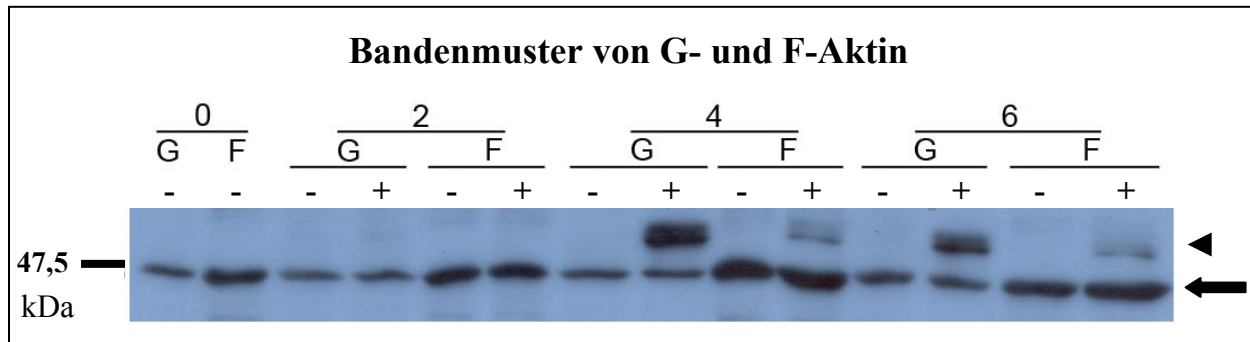


Abb. 21: Darstellung von G- und F-Aktin. Von HeLa-Zellen mit (-Dox) und ohne (+Dox) *LMX1B*-Expression wurde globuläres (G) bzw. fibrilläres (F) Aktin präpariert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Vergleich man die Bandenintensität der jeweiligen Ansätze, konnte kein Unterschied von *LMX1B*-exprimierenden zu nicht-exprimierenden Zellen festgestellt werden (siehe Banden auf Höhe Pfeil). Zur Kontrolle wurde der Western Blot ebenso mit *LMX1B*-Antikörper gefärbt, um eine tatsächliche Expression nur in Zellen ohne Doxyzyklin-Behandlung nachzuweisen (siehe Banden auf Höhe Pfeilkopf) [0, 2, 4, 6: Tage; G: globuläres Aktin; F: fibrilläres Aktin; „+“: *LMX1B*-Expression; „-“: keine *LMX1B*-Expression].

3.2.6 Podozyten von induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen weisen kein verändertes Membranpotential auf

Durch ein verändertes Membranpotential kann der Strukturaufbau und deren Regulierung gestört werden, was zu einer Umorganisation des Zytoskeletts und schließlich zu einem Verlust der Podozyten führen kann; Zellen mit einer Störung von Kaliumkanälen weisen auch eine geringere Motilität auf [Schwab et al., 2008]. Um dies näher untersuchen zu können, wurden die Membranpotentiale von Podozyten von induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen mit den Podozyten von Kontrollmäusen verglichen. Hierfür wurde die sog. „Slow-Whole-Cell“-Methode verwendet, die mit Hilfe des Lehrstuhls von Prof. Dr. R. Warth durchgeführt wurde (s.a. 2.2.21).

Zunächst wurde bei induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen die Inaktivierung von *Lmx1b* durch Gabe von 2 mg/ml Doxyzyklin mit 5% Sucrose für eine Woche induziert. Anschließend wurden die Glomeruli präpariert und nun durch Anlegen der

Patchpipette an den Podozyten die Membranpotential-Änderung unter verschiedenen Versuchsbedingungen gemessen. Zwei verschiedene Ansätze von Podozyten wurden getestet: Zum einen Podozyten, die nach einer Glomeruli-Präparation aus dem Glomerulus ausgewachsen waren und für 3 Passagen kultiviert wurden, und zum anderen Podozyten, die direkt nach einer Glomeruli-Extraktion noch am Glomerulus angeheftet waren. Nach Auswertung der Messergebnisse konnte sowohl bei noch anheftenden Podozyten als auch bei passagierten Podozyten kein Unterschied des Membranpotentials von Kontrollmäusen und *Lmx1b*-Knockout Mäusen festgestellt werden (s.a. Abb. 22). Dadurch konnte eine Fehlregulierung des Zytoskeletts durch eine eventuelle Änderung des Membranpotentials ausgeschlossen werden.

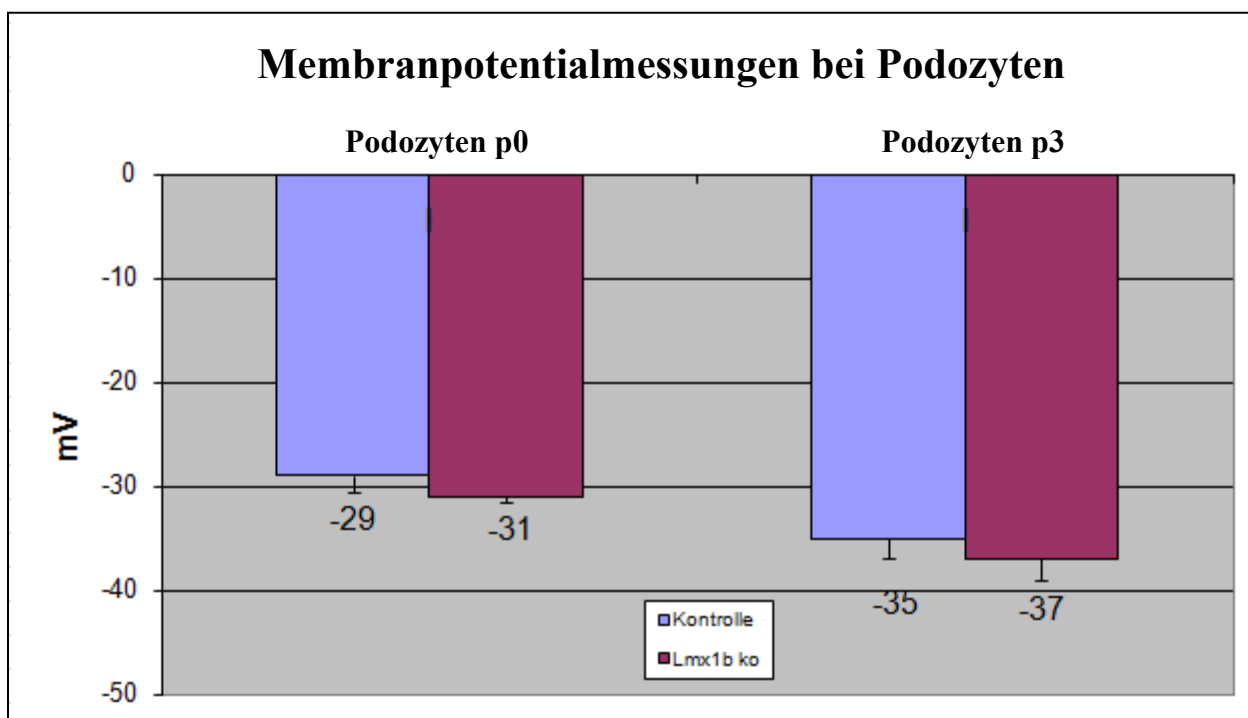


Abb. 22: Membranpotentialmessungen von Podozyten. Mit Hilfe der „Patch Clamp“-Methode wurde das Membranpotential von Podozyten gemessen. Hierbei ergaben sich sowohl bei noch am Glomerulus anhaftende (p0) als auch für passagierte Podozyten (p3) keine Unterschiede im Membranpotential.

3.2.7 Zellen mit LMX1B-Expression haften sich schneller an ihre Oberfläche

Da man bei Podozyten mit fehlerhafter *Lmx1b*-Expression eine schlechtere Bindung an ihre glomeruläre Basalmembran feststellen konnte und dies nicht mit einem Defekt in der Aktin-Organisation oder einer fehlerhaften Regulierung des Zytoskeletts begründet werden konnte, war es nun interessant herauszufinden, ob fehlerhafte Zell-Matrix-Kontakte die Ursache für den

Verlust von Podozyten sind. Da Podozyten sich über Integrine an ihre Oberfläche binden, war es Ziel dieses Versuchs, die Integrin-Bindung mittels eines Peptids zu stören. Bei diesem Peptid handelte es sich um zyklisches RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure), welches die Bindung der Zellen stört, indem es selbst als Ligand dient.

Bei diesem Versuchsansatz wurden HeLa-Zellen verwendet, die induzierbar LMX1B exprimieren konnten. Durch die Gabe von Doxyzyklin in das Medium wurde die Expression verhindert, entfernte man Doxyzyklin, wurde LMX1B exprimiert und der Effekt von LMX1B konnte beobachtet werden (s.a. 2.2.4 C). Für unsere Ansätze wurden HeLa-Zellen zunächst für 4 Tage mit und ohne Doxyzyklin kultiviert, trypsiniert und in mit Hepes gepuffertem Medium aufgenommen. Anschließend wurden 1×10^4 Zellen in den inneren Bereich einer 3 cm-Petrischale mit optischem Boden von ibidi ausgesät und sofort in das Mikroskop mit einer 37°C Brutkammer gelegt. Mit Hilfe des Programms MetaMorph wurde eine einstündige Aufnahme gestartet, bei der minütlich ein Bild von den Zellen aufgenommen wurde. Nach einer weiteren Bearbeitung mit ImageJ konnte nun ausgezählt werden, wie viele Zellen sich nach einer Stunde an die Oberfläche der Petrischale angeheftet und Fortsätze gebildet hatten. Ferner wurden die Bedingungen geändert, indem zu den Ansätzen verschiedene Konzentrationen an zyklischem RGD zugegeben wurden; hierbei wählte man, entsprechend Angaben aus der Literatur, die Konzentrationen von 100 nM, 1 μ M oder 10 μ M cRGD (s.a. 2.2.7).

Das deutlichste Ergebnis erhielt man bei der Verwendung von 1 μ M cRGD, bei dem wesentlich mehr Zellen an die Oberfläche binden konnten, wenn sie LMX1B exprimierten als im Vergleich zu nicht-exprimierenden Zellen (s.a. Abb. 23). Verwendete man kein oder nur wenig cRGD, wie z.B. bei 100 nM cRGD, konnte man noch keinen klaren Einfluss auf die Anheftung der Zellen in beiden Ansätzen beobachten. Verwendete man zu viel cRGD (10 μ M), war der Effekt des cRGD schon so groß, dass sich nach einer Stunde noch keine Zellen in beiden Ansätzen angeheftet hatten, so dass man hier einen längeren Beobachtungszeitraum hätte wählen müssen.

Der Befund, dass ohne LMX1B-Expression weniger Zellen an die Oberfläche binden konnten als mit LMX1B-Expression, gab einen ersten Hinweis auf eine Beteiligung von LMX1B bei der Organisation von Zellkontakten vermittelt durch Integrine. War LMX1B hingegen vorhanden, konnten die Zellen schneller an das Substrat binden, was einen wichtigen Hinweis auf eine Regulation der Bindung der Podozyten an die darunter liegende glomeruläre Basalmembran geben könnte.

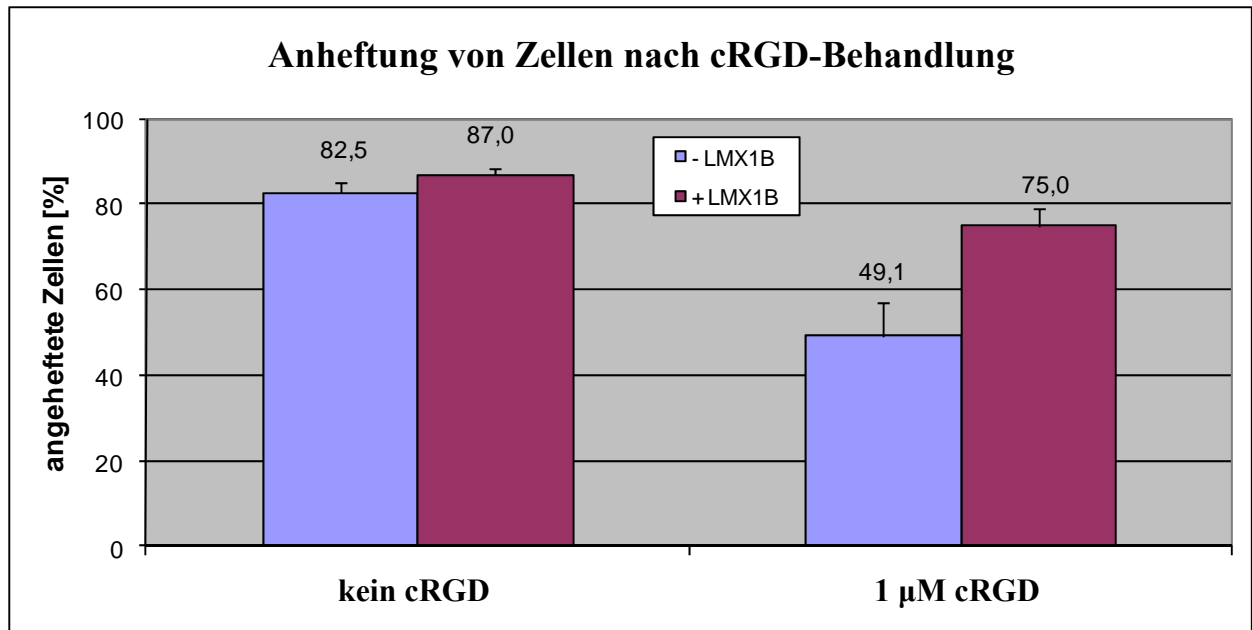


Abb. 23: Anheftung von Zellen. HeLa-Zellen mit bzw. ohne LMX1B-Expression wurden in Kulturschalen mit optischem Boden ausgesät und zyklisches RGD in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Nach Ablauf einer Stunde wurden die angehefteten Zellen der Ansätze gezählt und die Werte miteinander verglichen. Bei Gabe von 1 µM cRGD konnten deutlich mehr Zellen mit LMX1B-Expression an die Oberfläche binden und Ausläufer ausbilden als Zellen ohne LMX1B-Expression.

Ein *in vivo* Versuch, bei dem durch Gabe von zyklischen RGD über Mikroinjektionspumpen ein Ablösen von Podozyten in der Maus erreicht werden sollte, schlug leider fehl; es konnten keine abgelösten Podozyten im gesammelten Urin festgestellt werden, wodurch kein Vergleich von Kontrollmäusen und *Lmx1b*-Knockout Mäusen möglich war.

3.2.8 LMX1B-exprimierende Zellen produzieren vermehrt das an der Adhäsion beteiligte Protein $\alpha 3$ -Integrin

Da man aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine Beeinträchtigung von Integrinen entweder direkt oder über ihrer nachfolgenden Signalkaskade durch LMX1B annehmen kann, wurden weitere Punkte dieses Signalweges getestet. Zur Durchführung wurden wiederum HeLa-Zellen verwendet, in welchen LMX1B induziert bzw. nicht induziert wurden. Folgend wurden Proteinlysate von mehreren Zeitpunkten der Induktion gesammelt (Tag 0 bis Tag 6). Diese Proteinlysate wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese Membran wurde daraufhin mit verschiedenen Antikörpern inkubiert, um die Menge der entsprechenden Proteine zu bestimmen.

Analysierte man die Intensität der einzelnen Proteinbanden von ILK (Integrin-linked kinase) oder FAK (focal adhesion kinase) und verglich dabei LMX1B-exprimierende Zellen mit nicht-exprimierenden Zellen, konnte bei keinem der für die Zell-Matrix-Kontakt vermittelnden Proteine ein Unterschied erkannt werden. Lediglich für $\alpha 3$ -Integrin konnte ein Anstieg des Proteins in LMX1B-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (s.a. Abb. 24). Dies würde bedeuten, dass tatsächlich eine Bindung der Zellen an ihrer Oberfläche verstärkt wäre, reguliert durch LMX1B. Ebenso zeigte wiederum die Intensität der Aktin-Bande keinen Unterschied zwischen LMX1B-exprimierenden bzw. nicht-exprimierenden Zellen. Als Kontrolle wurde LMX1B nur in Zellen ohne Doxyzyklin nachgewiesen.

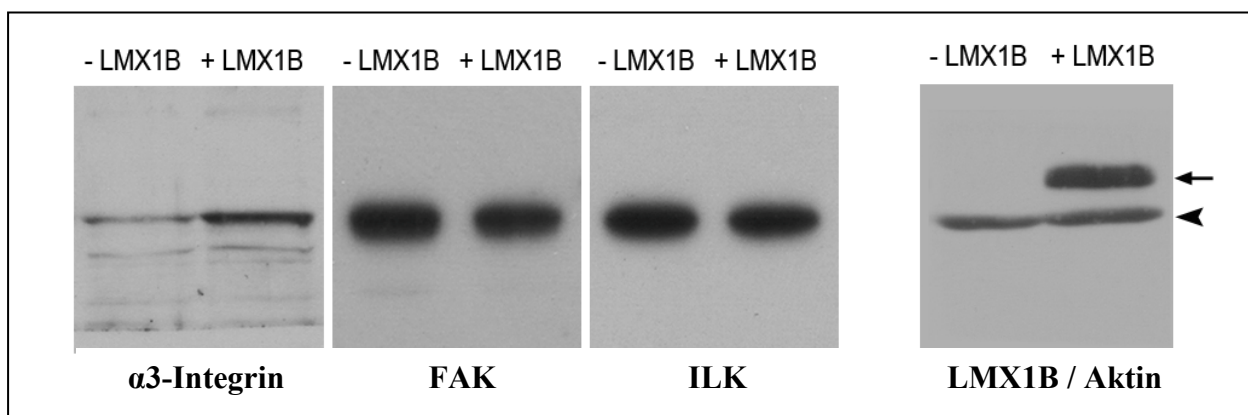


Abb. 24: Darstellung der Proteinexpression. LMX1B-exprimierende und nicht-exprimierende Zellen wurden bezüglich der Proteinmenge von für Zell-Matrix-Kontakte relevanten Proteinen untersucht. Hierbei konnte für FAK (focal adhesion kinase) oder ILK (integrin liked kinase) kein Unterschied in den beiden Zellansätzen festgestellt werden. Allerdings zeigte $\alpha 3$ -Integrin eine höhere Menge des Proteins in LMX1B-exprimierenden Zellen. Ebenso wurde für Aktin gezeigt, dass kein Unterschied in den beiden Ansätzen besteht (Pfeilkopf). Zur Kontrolle wurde LMX1B nur in Doxyzyklin-freien Zellen nachgewiesen (Pfeil).

3.2.9 Mikroarray-Analyse von für Adhäsion bzw. Zytoskelett verantwortlichen Genen

Um weitere Kandidaten von für die Vermittlung der Adhäsion oder Aufbau des Zytoskeletts beteiligten Genen aufzudecken, wurden die Ergebnisse des DNA-Mikroarrays herangezogen, der von Nieren von konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen durchgeführt wurde (s.a. 4.3). Es wurde versucht Gene zu finden, die bei einem Ausschalten von *Lmx1b* ebenso herabreguliert wurden, und somit ursächlich für den Kontaktverlust der Podozyten von der glomerulären Basalmembran sein könnten.

Eine Analyse des Mikroarrays von Nieren von konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen förderte 21 Gene zu Tage, die durch Inaktivierung von *Lmx1b* ebenfalls herabreguliert wurden und von denen in der Literatur ein Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts oder die Adhäsion beschrieben wurde. Eine Zusammenfassung dieser Gene wird in Tabelle 11 dargestellt:

<i>Symbol</i>	<i>Name</i>	<i>Regulation in Knockout Mäusen</i>
Cecam1	Cerebral endothelial cell adhesion molecule 1	3,87x ↓
Cgref1	Cell growth regulator with EF hand domain 1	3,00x ↓
Cldn15	Claudin 15	2,19x ↓
Cldn16	Claudin 16	2,06x ↓
Col4a3	Collagen type IV, alpha3	3,68x ↓
Col4a4	Collagen type IV, alpha4	2,42x ↓
Cml1	Camello-like 1	3,99x ↓
Egf	Epidermal growth factor	2,80x ↓
Fuz	Fuzzy homolog	2,06x ↓
Gja12	Gap junction protein, alpha 12	2,74x ↓
Gja3	Gap junction protein, alpha 3	2,71x ↓
Iqgap2	IQ motif containing GTPase activating protein 2	2,03x ↓
Itgb6	Integrin beta 6	3,34x ↓
Mamdc1	MAM domain containing 1	2,05x ↓
Nphs1	Nephrosis 1 homolog, nephrin	3,18x ↓
Nphs2	Nephrosis 2 homolog, podocin	28,13x ↓
Pfn3	Profilin 3	2,24x ↓
Podxl	Podocalyxin-like	2,81x ↓
Sdk1	Sidekick homolog 1	2,36x ↓
Spon2	Spondin 2	2,20x ↓
Tmem8	Transmembrane protein 8	2,20x ↓

Tab. 11: Aufstellung von Genen, die an der Vermittlung der Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix oder andere Zellen beteiligt sind und in konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen in der Niere signifikant reguliert wurden.

Bereits in der Einleitung wurde speziell auf die Gene *Col4a3*, *Col4a4*, *Nphs1* und *Nphs2* eingegangen, von denen eine Herabregulation in konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen unumstritten ist und somit an dieser Stelle erwartet werden durfte. Während allerdings die Kollagene und Podocin in Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom nicht beeinflusst zu sein scheinen, oder aber auch die immunhistologische Darstellung von Kollagen IV a4, Nephrin und

Podocin in induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen eine normale Färbung nach einer Woche Induktion aufweisen, konnte in Echtzeit-PCR-Läufen eine deutliche Verminderung der Expression von *Nphs1* oder *Nphs2* und eine geringe Minderung von *Col4a4* nachgewiesen werden. Nicht betroffen zu sein scheint *Col4a3*, welches zwar eine verminderte Expression in zwei Wochen induzierten Knockout Mäusen aufwies, nicht aber in für eine Woche induzierten Mäusen (s.a. Abb. 25).

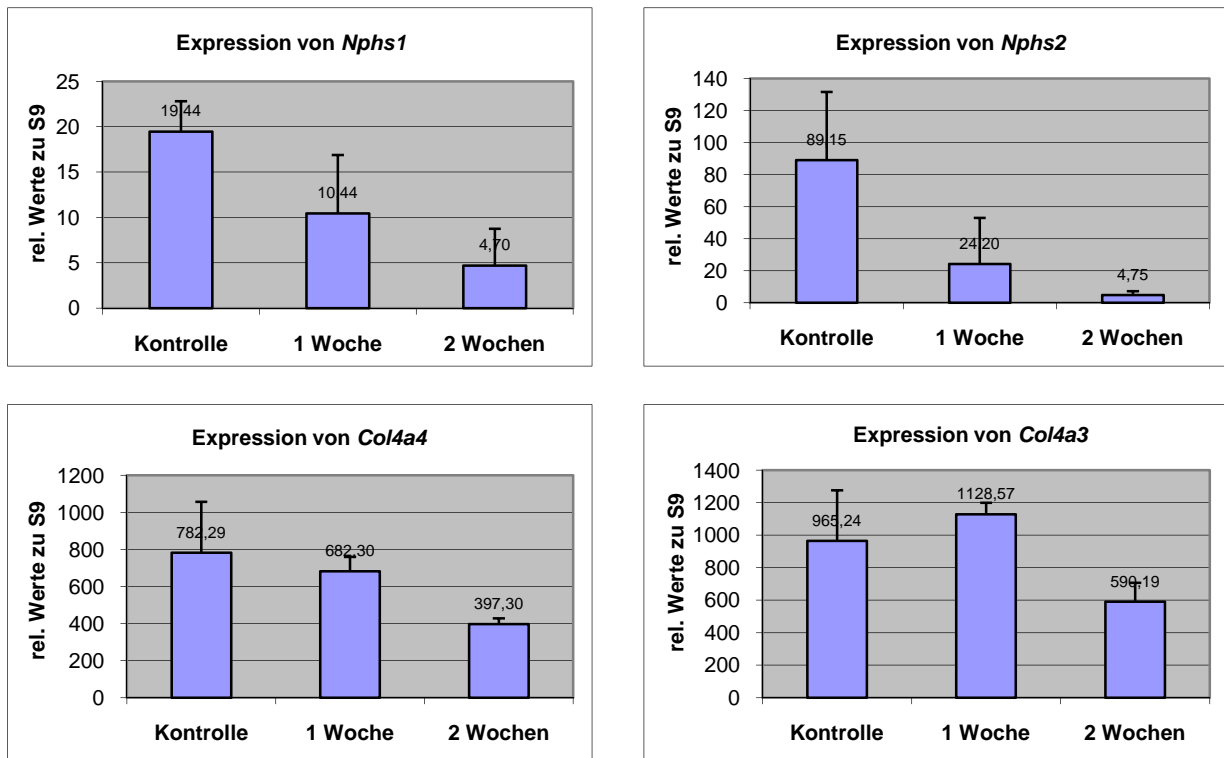


Abb. 25: Expressionsanalysen von Echtzeit-PCR Läufen. Von mit Doxyzyklin behandelten induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen wurden nach einer bzw. zwei Wochen die Nieren entnommen, hieraus RNA und cDNA präpariert und für Echtzeit-PCR Läufe verwendet. Während *Nphs1* und *Nphs2* stark nach einer Woche Induktion herabreguliert wurden, zeigte *Col4a4* nur einen geringen Rückgang der Expression in dieser Zeit. *Col4a3* hingegen wies erst nach zwei Wochen Induktion eine Abnahme seiner Expression auf.

Während in der Einleitung schon ausführlich auf die Funktionen dieser einzelnen Gene eingegangen wurde, wurden im Mikroarray noch weitere Gene von herausragender Bedeutung aufgedeckt, die einen Einfluss auf die Strukturhaltung und den Kontakt der Podozyten haben könnten. Diese sollen nun folgend beschrieben werden:

Cml1

Das Gen, welches für das Camello-like 1 Protein kodiert, wird vorwiegend in Nieren exprimiert, wobei das Protein vorwiegend in den Tubuli der Nierenrinde vorzufinden ist. Hier spielt *Cml1*

(synonym NAT8) vorwiegend eine Rolle sowohl bei der Entwicklung der embryonalen Niere als auch bei der Aufrechterhaltung der Struktur von adulten Nieren [Juhanson et al., 2008; Ozaki et al., 1998]. So beeinflusst eine Veränderung von NAT8 die herkömmliche Abfolge von Acetylierungen, welche wiederum mit Pharmaka- und Toxin-vermittelten Nierenschädigungen in Verbindung gebracht werden [Chambers et al., 2010]. Über eine spezifische Rolle in Podozyten ist noch nichts bekannt.

Podxl

Podocalyxin stellt eine wichtige Komponente der apikalen Plasmamembran von Podozyten dar und ist für die Bildung der negativen Ladungen entlang der apikalen Membran verantwortlich [Patrakka & Tryggvason, 2010]. *Podxl*-Knockout Mäuse zeigen einen Verlust der Fußfortsätze und der Schlitzmembran, was wiederum zur Bildung einer Proteinurie führt [Nielsen & McNagny, 2009]. Innerhalb der Podozyten wird Podocalyxin über Ezrin mit dem Aktin-Zytoskelett vernetzt, wodurch die Aufrechterhaltung der Struktur von Podozyten begründet wird. Ferner weisen Veröffentlichungen auf eine Regulation von *Podxl* durch den Transkriptionsfaktor Wt-1 hin [Palmer et al., 2001], wodurch die Beobachtung, dass auch die Expression von *Wt-1* in induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen nach einer Woche Doxyzyklin-Behandlung gesunken ist, nicht verwundert.

Sdk1

Kaufman et al. zeigten 2010, dass eine Überexpression von *Sdk1* zu einer fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) und somit zu einem Verlust der Nierenfunktion führen kann. Als Ursache für diese Dysfunktion wurde eine Verbindung von Sdk1 zu Magi-1 nachgewiesen, welches an der Schlitzmembran in Podozyten lokalisiert ist und als Linkerprotein sowohl zum Aktin-Zytoskelett der Podozyten dient als auch mit weiteren essentiellen Podozytenproteinen, wie z.B. Nephrin, Synaptopodin oder α -Aktinin-4, interagiert. Wird dieses Netzwerk nun durch eine Überexpression von *Sdk1* fehlerhaft reguliert, kommt es zu einem Umbau des Aktin-Zytoskeletts und somit zur Bildung einer FSGS [Kaufman et al., 2010]. Welchen Einfluss nun allerdings eine Herabregulierung von Sdk1 hierbei hat, ist nicht bekannt, aber ein fehlerhafter Aufbau der Zytoskelett-Struktur kann auch hier angenommen werden, was wiederum zur Bildung einer Proteinurie führen kann. Die Auswirkungen einer Herabregulierung von Sdk1 wurden bis heute noch nicht näher erforscht.

3.3 Untersuchung der Genexpression in konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen zur Identifizierung von Zielgenen

Galt das bisherige Augenmerk der Entschlüsselung von gewebsspezifischen Zielgenen von *Lmx1b* und deren Einflussnahme auf das jeweilige Organ oder den Organismus, so wurde jetzt eine andere Vorgehensweise zur Aufdeckung von weiteren Zielgenen von *Lmx1b* angewandt. Um potentielle allgemeinregulierte Zielgene von *Lmx1b* aufdecken zu können, wurde von verschiedenen *Lmx1b*-exprimierenden Organen der Maus Gewebe entnommen und deren einzelne Genexpression miteinander abgeglichen. Man erhoffte sich somit, dass durch eine differenzierte Regulation von Zielgenen durch *Lmx1b* in den einzelnen Geweben neue, noch nicht bekannte Zielgene aufgedeckt werden könnten. Hieraus ließen sich weitere Funktionen des Transkriptionsfaktors *Lmx1b* erschließen und würden dadurch neue Forschungsansätze ermöglichen.

3.3.1 Expressionsanalyse von *Lmx1b* in einzelnen Organen

Bevor Expressionsstudien durchgeführt werden konnten, wurde zuerst ein Expressionsprofil von Organen von neugeborenen Mäusen erstellt. Dies sollte dazu dienen, von verschiedenen Organen die jeweiligen Expressionsspiegel von *Lmx1b* bestimmen zu können. Hierfür wurden von neugeborenen *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen Nieren, Augen, Gehirn, vordere und hintere Gliedmaßen sowie die Leber entnommen und die RNA präpariert (s.a. 2.2.24). Nach Synthese der cDNA wurde diese in einer quantitativen Echtzeit-PCR verwendet und jeweils auf *Lmx1b*-Expression getestet. Wie bereits in der Literatur beschrieben, konnte in Wildtyp-Mäusen eine *Lmx1b*-Expression in Niere, Auge, Gehirn und den Gliedmaßen nachgewiesen werden (s.a. Abb. 26). Keine Expression fand man in der Leber, welche in späteren Analysen als Negativ-Kontrolle dienen sollte. Als zusätzliche Kontrolle wurden auch die Organe der homozygoten *Lmx1b*-Knockout Mäuse getestet, in der jeweils keine *Lmx1b*-Expression nachzuweisen war.

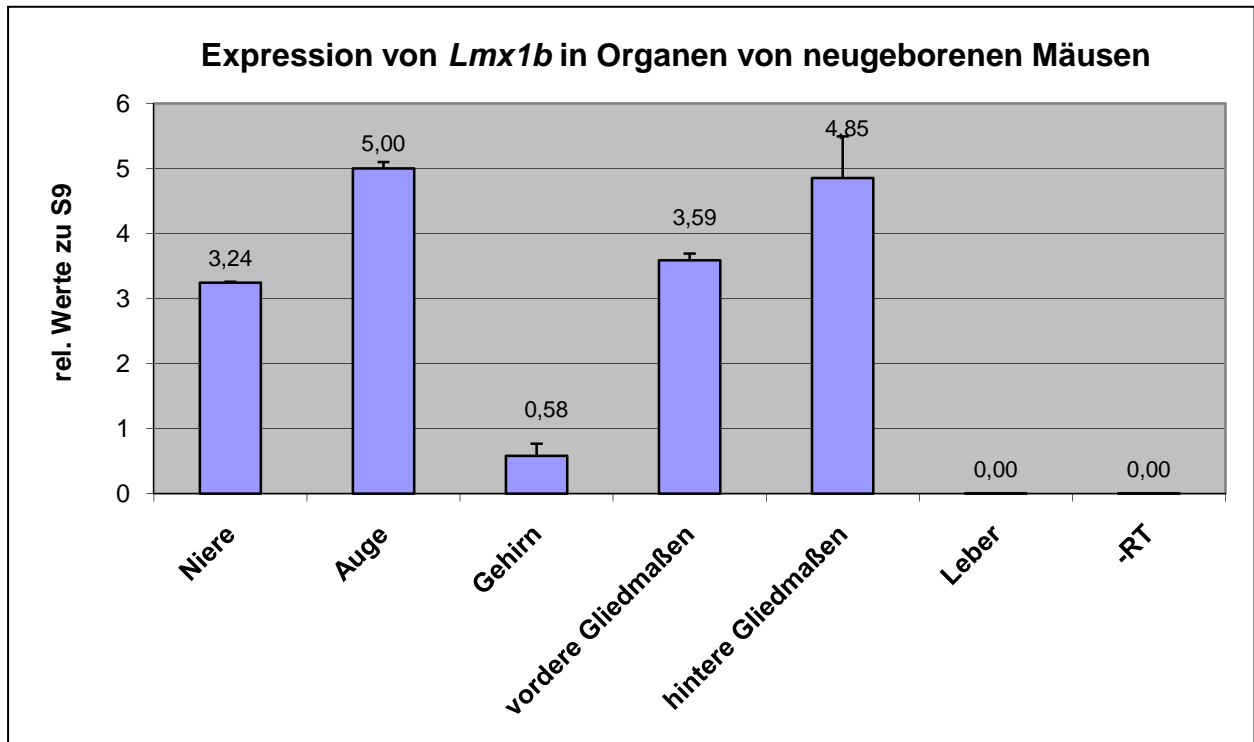


Abb. 26: *Lmx1b*-Expression in verschiedenen Organen. Nach Präparation von RNA und cDNA aus verschiedenen Organen von neugeborenen Mäusen konnte eine Expression von *Lmx1b* in Niere, Auge, Gehirn und den Gliedmaßen nachgewiesen werden, allerdings keine Expression in der Leber [-RT: Probe ohne Reverse Transkriptase]

Als Organe für den nachfolgenden DNA-Mikroarray wurden Niere, Auge und die vorderen Gliedmaßen ausgewählt, ebenso wie die Leber, in der keine *Lmx1b*-Expression nachgewiesen werden konnte; diese diente als Negativ-Kontrolle. Nach Präparation der RNA und Kontrolle der Qualität wurde diese dem „Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik“ übergeben, die nun die Proben auf einem „Agilent Chip“ testeten.

3.3.2 Analyse des Mikroarray

Nach Durchführung des DNA-Mikroarrays am „Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik“ und deren Auswertung der Signale für die jeweils getesteten Gene wurde eine Exceltabelle erhalten, in der die Gene aufgelistet wurden, welche in den einzelnen Geweben der *Lmx1b*-Knockout Mäuse entweder hinauf- oder herabreguliert wurden. Ferner wurde ein Schwellenwert gesetzt, der jetzt nur Gene anzeigte, die eine mehr als 2fach höhere oder niedrigere Expression aufwiesen als ihre Werte in den Kontrollmäusen.

Nach Ordnung dieser Gene konnte man feststellen, dass 2739 Gene im Auge eine signifikante Regulation besitzen. Hiervon zeigten 1887 Gene eine mehr als 2x höhere Expression (max. 222x) und 852 Gene eine mindestens 2x niedrigere Expression (max. 15x) in *Lmx1b*-Knockout Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Betrachtete man das Genexpressionsprofil der vorderen Gliedmaßen konnte man feststellen, dass, nach Inaktivierung von *Lmx1b*, 995 Gene eine signifikante Regulation aufwiesen, wobei 271 Gene um mehr als das 2fache heraufreguliert (max. 9x) und 724 Gene um mehr als das 2fache herabreguliert (max. 230x) wurden. Im Fall der Niere konnten 1581 signifikant regulierte Gene bei Deletion von *Lmx1b* festgestellt werden. Hiervon wurden 688 Gene hochreguliert (max. 28x) und 893 Gene herabreguliert (max. 82x). In der Leber, in welcher kein *Lmx1b* exprimiert wurde, wurden von den 2063 signifikant regulierten Genen in *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen 799 Gene heraufreguliert (max. 45x) bzw. 1264 Gene herabreguliert (max. 27x).

Verglich man nun die signifikant regulierten Gene der Nieren, Augen und Gliedmaßen mit den regulierten Genen der Leber, welche ja als Negativ-Kontrolle ohne *Lmx1b*-Expression diente, konnten einige Gene ausgeschlossen werden, da sie in der Kontrolle ebenso reguliert wurden wie in den einzelnen Organen. So blieben 351 signifikant regulierte Gene übrig, von denen 185 Gene mit doppelter übereinstimmender Erwähnung (83 herabreguliert, 102 heraufreguliert), 18 mit dreifacher übereinstimmender Angabe (7 herabreguliert, 11 heraufreguliert) und 148 mit unterschiedlicher Regulation in den einzelnen Organen aufgeführt wurden. Diese konnten weiter bezüglich ihrer Relevanz oder Regulation auf insgesamt 47 Gene eingegrenzt werden, welche sich wie folgt aufschlüsseln (s.a. Tab. 13).

Symbol	Name	Nieren	Augen	Gliedmaßen	Leber
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	6,14 ↑	6,73 ↑	2,02 ↑	-
Cdc6	Cell division cycle 6	2,19 ↓	2,27 ↓	2,55 ↓	-
Ceacam1	Cerebral endothelial cell adhesion molecule 1	3,87 ↓	2,24 ↓	5,93 ↓	-
Col25a1	Collagen type XXV, alpha 1	2,23 ↑	3,75 ↑	3,36 ↑	-
Dgkb	Diacylglycerol kinase, beta	2,85 ↓	2,57 ↓	2,36 ↓	-
Gna13	Guanine nucleotide binding protein, alpha 13	2,50 ↑	2,65 ↑	2,23 ↑	-
Il10	Interleukin 10	3,59 ↑	6,53 ↑	5,85 ↑	-
Lta	Lymphotoxin alpha	3,08 ↑	2,83 ↑	2,09 ↑	-
Olf920	Olfactory receptor 920	2,81 ↑	3,60 ↑	4,70 ↑	-
Pde6g	Phosphodiesterase 6G	2,03 ↓	4,90 ↓	2,38 ↓	-
Pola1	Polymerase, alpha 1	2,43 ↓	2,73 ↓	2,83 ↓	-
Prdx4	Peroxiredoxin 4	3,11 ↑	2,20 ↑	3,30 ↑	-
Ptgds	Prostaglandin D2 synthase	4,67 ↑	2,24 ↑	2,63 ↑	-
Rtp4	Receptor transporter 4	3,77 ↑	6,92 ↑	2,21 ↑	-
Svep1	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain	2,99 ↑	4,95 ↑	2,39 ↑	-

Arhgef6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	4,15 ↑	3,28 ↑	-	-
Bcl3	B-cell leukemia/lymphoma	-	6,04 ↑	2,49 ↑	-
Card15	Caspase recruitment domain family, member 15	-	2,46 ↑	2,29 ↑	-
Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	-	5,28 ↑	2,68 ↑	-
Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	2,13 ↑	2,11 ↑	-	-
Col4a3	Collagen type IV, alpha 3	3,68 ↓	2,78 ↓	-	-
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	8,71 ↑	4,95 ↑	-	-
Fas	TNF receptor superfamily, member 6	2,50 ↑	2,02 ↑	-	-
FasL	Fas ligand	2,23 ↑	3,33 ↑	-	-
Gdf5	Growth differentiation factor 5	2,06 ↓	-	2,45 ↓	-
Guca1a	Guanylate cyclase activator 1a	-	5,31 ↓	2,49 ↓	-
Guca1b	Guanylate cyclase activator 1b	2,10 ↓	2,21 ↓	-	-
Ifi204	Interferon activated gene 204	2,46 ↑	5,66 ↑	-	-
Ifi205	Interferon activated gene 205	2,33 ↑	4,31 ↑	-	-
Ifi27	Interferon, alpha-inducible protein 27	4,16 ↑	4,50 ↑	-	-
Ifih1	Interferon-induced with helicase C domain 1	2,86 ↑	3,44 ↑	-	-
Ifit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	6,33 ↑	7,10 ↑	-	-
Ifit3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	3,01 ↑	-	2,07 ↑	-
Il1rl1	Interleukin 1 receptor-like 1	-	15,95 ↑	6,60 ↑	-
Irak3	Interleukin-1 receptor-associated kinase 3	4,56 ↑	5,50 ↑	-	-
Irf7	Interferon regulatory factor 7	4,93 ↑	4,80 ↑	-	-
Lox	Lysyl oxidase	2,11 ↑	3,97 ↑	-	-
Pdlim5	PDZ and LIM domain 5	2,26 ↑	-	2,01 ↑	-
Rnd1	Rho family GTPase 1	2,02 ↑	2,51 ↑	-	-
Tnfrsf9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	3,18 ↑	3,68 ↑	-	-
Usp18	Ubiquitin specific peptidase 18	5,04 ↑	6,47 ↑	-	-
Cldn3	Claudin 3	2,51 ↑	2,92 ↑	2,49 ↓	-
Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	-	3,26 ↑	-	2,18 ↓
Fgf1	Fibroblast growth factor 1	-	2,45 ↑	-	6,50 ↓
Itga11	Integrin, alpha 11	-	5,98 ↑	-	2,01 ↓
Muc4	Mucin 4	2,05 ↑	-	-	3,39 ↓
Rds	Retinal degeneration, slow	2,52 ↑	3,97 ↓	-	-

Tab. 13: Auflistung von signifikant regulierten Genen in konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen. In grün dargestellt sind Gene, die in Niere, Auge und vorderen Gliedmaßen gleichermaßen reguliert wurden, in blau sind Gene genannt, die in zwei Organen gleichfalls reguliert wurden und in rot wurden Gene mit unterschiedlicher Regulation in den einzelnen Organen aufgeführt. Werte geben die xfache Regulation in *Lmx1b*-Knockout Mäusen an. [↑: Gen wurde in *Lmx1b*-Knockout Mäusen heraufreguliert; ↓: Gen wurde in *Lmx1b*-Knockout Mäusen herabreguliert; „-“: kein Messergebnis].

Diese Gene wurden entsprechend ihrer Relevanz, den bisherigen Forschungsergebnissen und Regulation in den einzelnen Organen eingeordnet. Eine Funktionsübersicht dieser ausgewählten Gene ergab, dass 21 Gene einen Einfluss auf die Immunantwort besitzen, 16 Gene haben eine Bedeutung für Struktur und Adhäsion, 9 Gene wurden mit Apoptose in Verbindung gebracht, 4 Gene haben einen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus und 4 Gene werden spezifisch in der Niere exprimiert. Eine Übersicht ist in Abbildung 27 dargestellt.

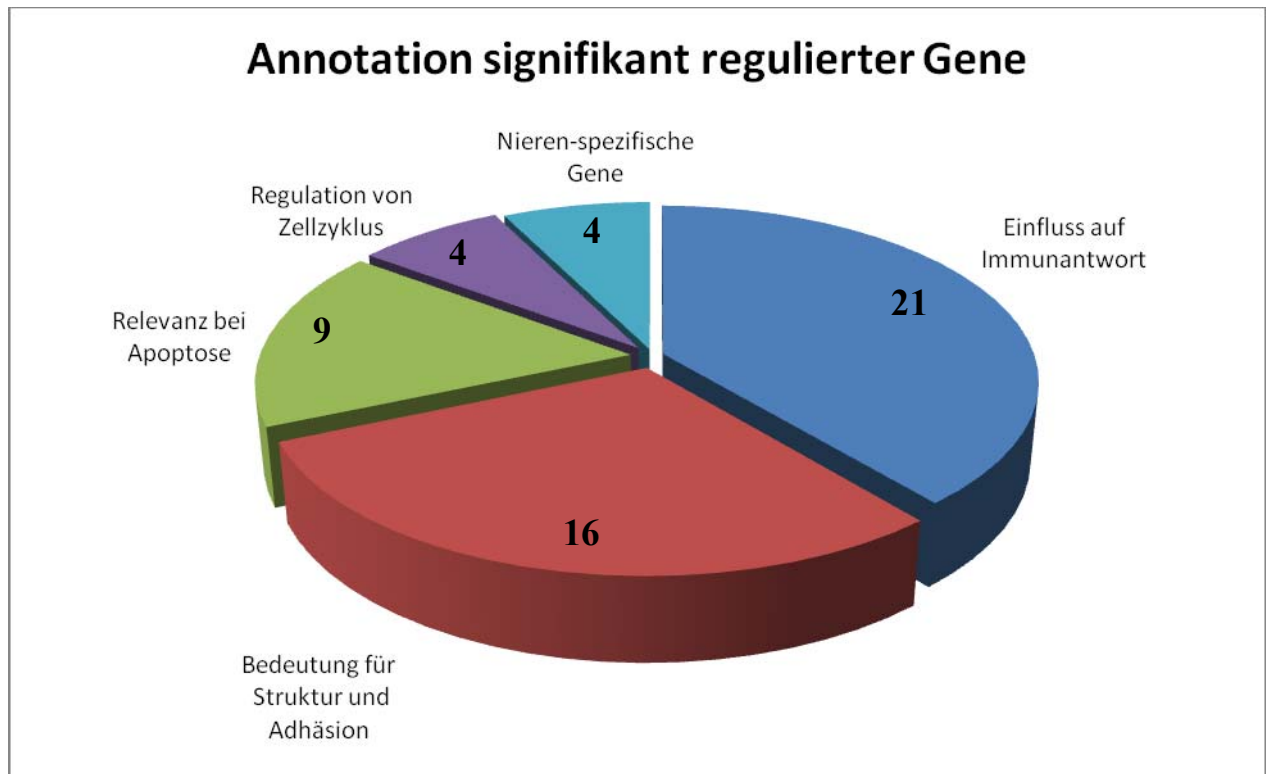


Abb. 27: Annotationen signifikant regulierter Gene. Nach Auswertung der Daten eines DNA-Mikroarrays von verschiedenen Organen konventioneller *Lmx1b*-Knockout Mäuse wurden verbleibende signifikante Gene nach ihrer Funktion geordnet. Die Werte geben die Anzahl an Genen an, die dieser Gruppe zugeordnet werden können, Mehrfachnennungen sind möglich.

Von diesen 47 aufgelisteten Genen wurden 15 Gene in Auge, Niere und Gliedmaßen gleichermaßen reguliert. Da man sich bei dieser Suche auf allgemein regulierte Zielgene von *Lmx1b* beschränken wollte, wurden die Funktionen nur dieser Gene genauer betrachtet.

***Ccl2* = Chemokine (C-C motif) ligand 2**

Ccl2 (synonym *Mcp-1*) sorgt für die Rekrutierung inflammatorischer Monozyten in verschiedenen Geweben. So wird *CCL2* für die Ausbildung der diabetischen Nephropathie verantwortlich gemacht, bei der die Akkumulation von Makrophagen in der Niere gefördert wird. Wurde in Mausstudien die Anhäufung von Makrophagen in der Niere verhindert, bildete sich keine diabetische Nephropathie aus [Giunti et al., 2010; Tesch, 2008].

***Cdc6* = Cell division cycle 6**

Cdc6 ist ein wichtiger Regulator für die Initiation der Replikation in Zellen; hierbei erreicht *Cdc6* ein Expressionsmaximum in der späten Mitose- bzw. frühen G_1 -Phase. Entfernt man *Cdc6* in der G_1 -Phase, bleiben die Chromosomen unrepliziert, da der Mitose-Spindelapparat nicht ausgebildet wurde [Boronat & Campbell, 2008]. Mit Butyrat behandelte Epithelzellen von

Rindernieren zeigten einen Zellzyklus-Arrest in der G₁/S-Phase, wobei eine gleichzeitige Herabregulierung von *Cdc6* festzustellen war [Li & Elsasser, 2005].

Ceecam1 = Cerebral endothelial cell adhesion molecule 1

Die Blut-Hirn-Schranke wird aus Tight Junctions des cerebralen Kapillarendothels gebildet. Die Migration von Leukozyten durch diese Blut-Hirn-Schranke wird durch Ceecam1 gefördert, wobei Ceecam1 die Adhäsion der Leukozyten an das Kapillarendothel fördert [Starzyk et al., 2000]. Die molekularen Mechanismen hierüber sind noch unklar.

Col25a1 = Collagen type XXV, alpha 1

Dieses Transmembranprotein wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert, welche aus Plaques von Gehirnen von Alzheimer Patienten gewonnen wurden. Dort bewirkt COL25A1 eine Aggregation von Amyloid β -Peptiden [Tong et al., 2010]. Über eine Funktion in Podozyten ist bislang nichts bekannt.

Dgkb = Diacylglycerol kinase, beta

Diese Kinase ist ein Regulator der intrazellulären Konzentration von Diacylglycerol (DAG) durch Konversion von DAG zu PA (Phosphatidsäure). Hierdurch werden viele intrazelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Migration und Differentiation gesteuert [Merida et. al., 2008]. Die Bedeutung von Dgkb in Podozyten ist noch ungeklärt.

Gna13 = Guanine nucleotide binding protein, alpha 13

Über G-Proteine, zu denen auch Gna13 gehört, werden zahlreiche intrazelluläre Prozesse wie Proliferation, Organisation des Zytoskeletts, Differenzierung, Migration oder embryonale Entwicklung geregelt. So konnte eine Beteiligung von GNA13 zusammen mit RGS22 an der Spermio-genese von Mensch und Maus nachgewiesen werden [Hu et al., 2008]. Fiedler et al. konnte 2008 eine Regulation der Aktinpolymerisation durch eine Gna13-vermittelte Signalkaskade, gesteuert durch RhoA, in Spermatozoen von Rindern beweisen. Über eine Regulation von Gna13 in Podozyten ist bisher nichts bekannt.

IL10 = Interleukin 10

IL10, ein anti-inflammatorisches Zytokin, spielt eine herausragende Rolle in der Immun-regulation von T-Lymphozyten. So zeigten *Il10*-Knockout Mäuse nach Induktion einer Glomerulonephritis durch Gabe von anti-GBM Globulinen einen schwereren Verlauf der

Erkrankung mit erhöhter Anzahl an Halbmonden, gehäuften Ansammlungen von Makrophagen, zahlreichen Ablagerungen von Fibrin und gestiegenen Serum-Kreatinin-Werten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, die ebenso behandelt wurden [Kitching et al., 2000]. In einem weiteren Glomerulonephritis-Model in BXS-B-Mäusen konnte eine höhere *Il10*-Expression in Nieren festgestellt werden als in Nieren der dazugehörigen Kontrollmäuse [Kimura et al., 2011]. Zudem ist *Il10* an der Regulation des JAK-STAT-Signalweges beteiligt und kann NF- κ B blockieren oder aber auch die IFN- γ Produktion von Th1-Zellen inhibieren.

Lta = Lymphotoxin alpha

Lymphozyten produzieren dieses Zytokin, welches ein Mitglied der TNF Familie ist und als Ligand für verschiedene TNF-Rezeptoren dient. So kann es über diese Bindung Signalkaskaden regulieren, um Apoptose auszulösen oder NF- κ B zu aktivieren. Eine Funktion in Podozyten ist nicht bekannt.

Olf920 = Olfactory receptor 920

Olfaktorische Rezeptoren sind für die Detektion von Geruchsmolekülen verantwortlich. Hat ein Ligand an den Rezeptor gebunden, wird ein G-Protein gekoppelter Signalweg aktiviert, der die Information in das Gehirn weiterleitet. Detailliertere Informationen sind über *Olf920* nicht bekannt.

Pde6g = Phosphodiesterase 6G

Mutationen in diesem Gen sind für die autosomal-rezessive Form von Retinitis pigmentosa verantwortlich, einer Erkrankung der Augen, die sich u.a. in Nachtblindheit oder einem eingeschränktem Gesichtsfeld äußert. Sowohl bei Patienten als auch bei Mäusen kann eine gestörte Expression in den Fotorezeptoren der Stäbchen gefunden werden, was zu einer fehlerhaften Signalweiterleitung führt [Dvir et al., 2010]. Über die Rolle in Podozyten ist nichts bekannt.

Pol1 = Polymerase, alpha 1

Eine entscheidende Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation spielt *Pol1*, welches für die katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase kodiert. Untersuchungen mit mutiertem *Pol1* wiesen einen Arrest des Zellzyklus in der S-Phase sowohl in Mäusen als auch in NIH3T3 Zellen nach [Eichinger et al., 2009]. Daten zur Funktion in Podozyten wurden noch nicht erhoben.

Prdx4 = Peroxiredoxin 4

Mitglieder der Peroxiredoxin-Familie können zum einen die Wasserstoffperoxid-vermittelte Signalweiterleitung modulieren und zum anderen NF- κ B regulieren. So zeigten Spermatiden von *Prdx4*-Knockout Mäusen eine erhöhte Sterblichkeit auf oxidativen Stress als ihre Wildtyp Kontrollen [Iuchi et al., 2009]. Eine Rolle in Podozyten ist nicht bekannt.

Ptgds = Prostaglandin D2 synthase

Hauptaufgabe von Ptgds ist die Konversion von Prostaglandin H2 zu Prostaglandin D2. Damit einhergehend kann Ptgds in viele Zellabläufe eingreifen und Einfluss darauf nehmen, wie z.B. in der Kontraktion der glatten Muskelzellen, Hemmung der Aggregation von Blutplättchen oder der Versorgung und Reifung des zentralen Nervensystems. Im Fall der Niere kann Ptgds, durch Messungen der Serumkonzentration im Urin als Indikator für die Schwere einer renalen Schädigung bei Diabetes Typ 2 sein [Uehara et al., 2009].

Rtp4 = Receptor transporter 4

Rtp4 wird von Interferonen induziert und kodiert für ein Protein, das als antiviraler Effektor gegen Pathogene dient [Schoggins et al., 2011].

Svep1 = Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain

Die Inhibierung von *SVEP1* in humanen Endothelzellen aus der Vena umbilicalis resultiert in einem Anstieg von ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1) und E-Selectin [Schwanzer-Pfeiffer et al., 2010]. Bei Vermittlung der Adhäsion von mesenchymalen Zellen an ihrer Oberfläche konnte eine Beteiligung von SVEP1 bereits nachgewiesen werden [Shefer & Benayahu, 2010]. Über eine Beteiligung in Podozyten ist noch nichts bekannt.

3.4 Untersuchungen des Immunsystems an konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen

Expressionsstudien aus DNA-Mikroarray-Analysen und quantitativen Echtzeit-PCR Läufen zeigten einen Einfluss von LMX1B auf Interferone, Interleukine und Interferon-stimulierbaren Genen [Neumann, 2008; diese Arbeit]. Ebenso zeigten Vorexperimente von Michel Le Hir (nicht veröffentlichte Daten) eine mögliche Beeinträchtigung der Immunantwort in *Lmx1b*-defizienten Mäusen. Dies brachte nun die Frage auf, in welcher Weise *Lmx1b* Einfluss auf die Regulation des Immunsystems nimmt.

Für diese Analysen verwendeten wir konventionelle *Lmx1b*-Knockout Mäuse, die bereits schon im Hinblick auf ihre morphologischen Veränderungen beschrieben wurden. Allerdings sterben homozygote *Lmx1b*-Knockout Tiere innerhalb von 24 h, so dass für weiterführende Experimente nur heterozygote *Lmx1b*-Knockout Mäuse verwendet werden konnten. Erste Vorexperimente bezüglich einer differenzierten Regulation des Immunsystems in *Lmx1b*-Knockout Mäusen zeigten bereits eine mögliche Beteiligung von *Lmx1b* in der Regulation des Immunsystems. Erste Analysen des Immunsystems brachten keine Veränderungen in der T- und B-Zell-Antwort oder des Komplementsystems zu Tage [Kastner, 2004]. Eine Analyse von Milzzellen mittels eines Proliferations-Assays zur Untersuchung von proinflammatorischen Zytokinen zeigte eine mögliche erhöhte IFN γ -Konzentration bei heterozygoten *Lmx1b*-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen; dieses Ergebnis war allerdings nicht konsistent. Um einen eventuellen Einfluss und Regulation von *Lmx1b* auf das Immunsystem von Mäusen näher zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Immunsystem-Analysen durchgeführt.

3.4.1 Konventionelle heterozygote *Lmx1b*-Knockout Mäuse zeigen eine verringerte Expression von Interferonen in Milz und Thymus

Um einen eventuellen Einfluss von *Lmx1b* auf immunrelevante Gene in der Maus untersuchen zu können, wurden entsprechende Organe sowohl von adulten *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen als auch von neugeborenen *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen entfernt und diese auf unterschiedliche Expression von Interferonen getestet. Hierbei wurden Milz und Thymus von den oben genannten Mäusen entnommen, die Organe in flüssigem Stickstoff überführt und für

eine anschließende RNA-Präparation verwendet. Diese RNA diente daraufhin als Grundlage für eine folgende quantitative Echtzeit-PCR Analyse.

Betrachtet man die Expression von *Ifna* (Interferon-alpha), *Ifnb* (Interferon-beta) und *Ifng* (Interferon-gamma) in der Milz und Thymus von neugeborenen *Lmx1b*^(+/+)- bzw. *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen, konnte man feststellen, dass diese nur sehr geringe Expressionsspiegel für diese Gene aufwiesen. Ebenso konnte man hier keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von Wildtyp zu homozygotem Knockout feststellen, lediglich eine leichte Tendenz zu einer verminderten Expression in *Lmx1b*-Knockout Mäusen ist erkennbar (s.a. Abb. 28).

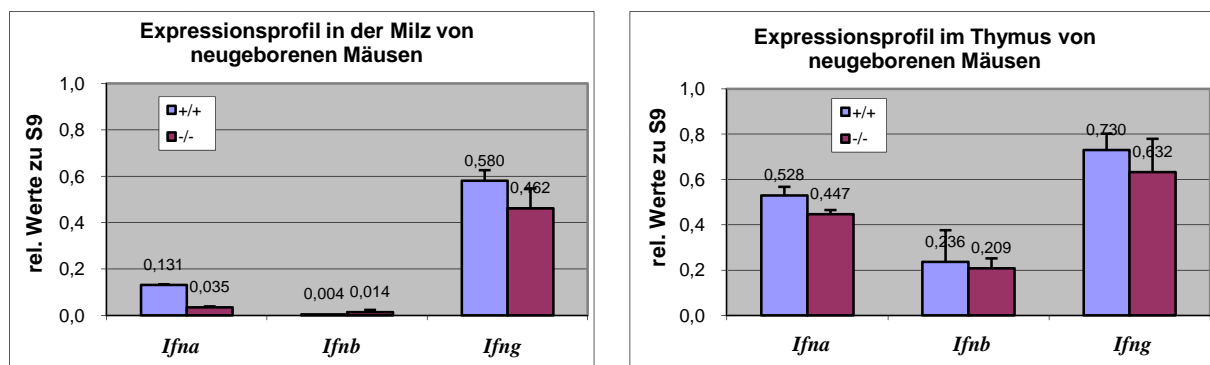


Abb. 28: Echtzeit-PCR Messungen von Milz und Thymus von neugeborenen Mäusen. Vergleich man die Expression von *Ifna*, *Ifnb* und *Ifng* in Milz und Thymus von neugeborenen Wildtyp (+/+) Mäusen mit denen von homozygoten (-/-) Knockout Mäusen, konnte kein signifikanter Unterschied in den jeweiligen Expressionsspiegeln dieser Gene gemessen werden.

Vergleich man nun die Expressionsspiegel in adulten Mäusen von Wildtyp und heterozygoten *Lmx1b*-Knockout Mäusen konnte man eine deutliche Herabregulation von *Ifna*, *Ifnb* und *Ifng* im Thymus sowie eine Herabregulierung von *Ifng* in der Milz feststellen. Dies wies auf eine mögliche Regulation von *Ifna*, *Ifnb* oder *Ifng* durch *Lmx1b* hin. Betrachtete man nun allerdings die Expressionsspiegel von *Lmx1b* in Milz und Thymus, konnte man kein *Lmx1b* in der Milz und nahezu kein *Lmx1b* im Thymus feststellen, wodurch sich die Frage stellte, inwiefern *Lmx1b* einen Einfluss auf die Herabregulierung von Interferonen nimmt, da es ja selbst in diesen Organen nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird (s.a. Abb. 29).

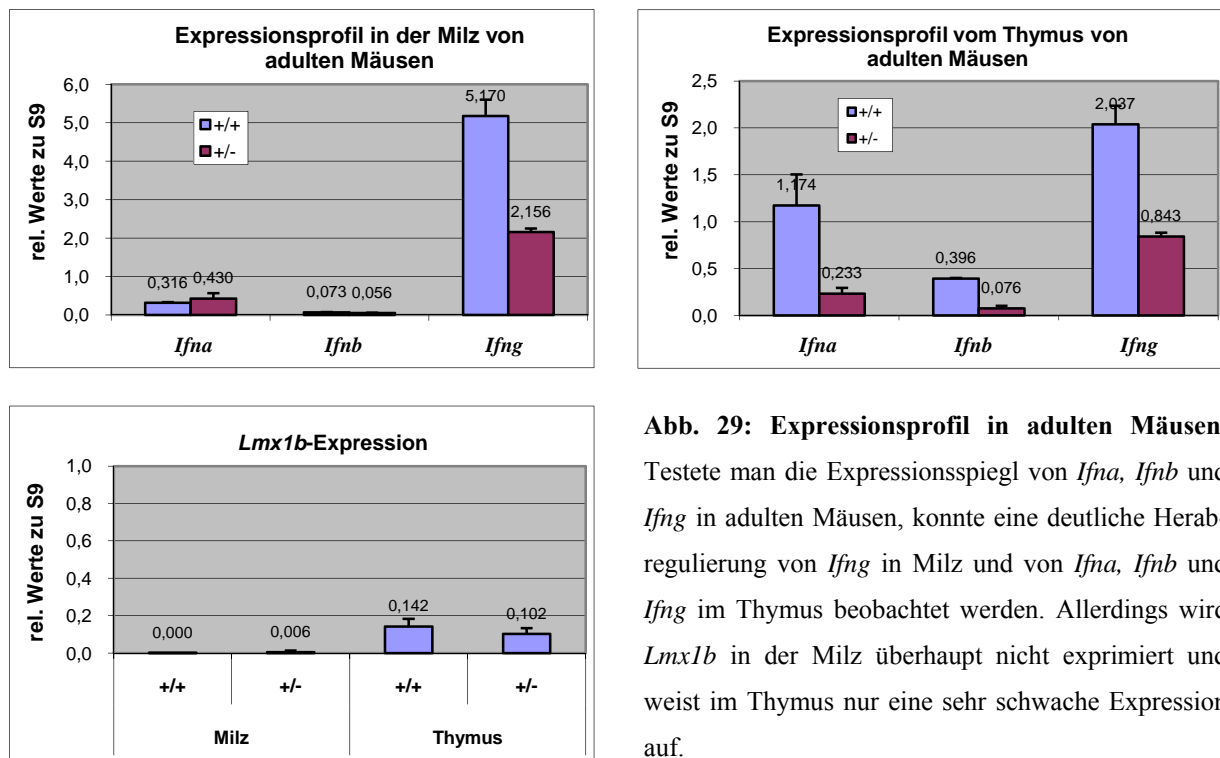


Abb. 29: Expressionsprofil in adulten Mäusen.

Testete man die Expressionsspiegel von *Ifna*, *Ifnb* und *Ifng* in adulten Mäusen, konnte eine deutliche Herabregulierung von *Ifng* in Milz und von *Ifna*, *Ifnb* und *Ifng* im Thymus beobachtet werden. Allerdings wird *Lmx1b* in der Milz überhaupt nicht exprimiert und weist im Thymus nur eine sehr schwache Expression auf.

3.4.2 Dendritische Zellen exprimieren kein *Lmx1b*

Um nun den Effekt der Herabregulierung von Interferonen in Milz und Thymus erklären zu können, wurden in Geweben einwandernde Zellen auf *Lmx1b*-Expression untersucht. Sollte hier eine *Lmx1b*-Expression nachgewiesen werden können, könnte dies Aufschluss über eine mögliche Regulierung der Interferone über diese Zellen geben. Bei den untersuchten Zellen handelte es sich sowohl um dendritische Zellen als auch um Makrophagen (s.a. 4.4.3), welche eine hohe immunologische Relevanz aufweisen.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Falk wurden dendritische Zellen sowohl aus dem Colon als auch aus dem Knochenmark gewonnen. Um dendritische Zellen aus dem Knochenmark zu erhalten, wurde zunächst das Knochenmark einer Maus entnommen, deren Zellen für eine Woche mit 5 ng GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor) in Zellkulturplatten kultiviert und anschließend für 16 h mit CpG stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen in einem Parallelansatz mit 1x PBS behandelt, was zu keiner Aktivierung führen sollte. Ferner wurden dendritische Zellen aus dem Colon gewonnen. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, um dendritische Zellen zum einen von einer chronischen Colitis und zum anderen von einer akuten Colitis zu erhalten. Zur Induktion einer

chronischen Colitis wurde den Mäusen DSS (Dextran Sodium Sulfat) für eine Woche gegeben, anschließend normales Trinkwasser verabreicht und dieser Zyklus viermal wiederholt. Um dendritische Zellen von einer akuten Colitis zu erhalten, wurde das Colon nach einer Woche mit DSS-Behandlung entnommen. Anschließend wurden die Zellen entsprechend den dendritischen Zellen aus dem Knochenmark weiterbehandelt. Als Kontrolle dienten hier unbehandelte Balb/c Mäuse (s.a. 2.2.23 D). Untersuchte man nun aktivierte und nicht-aktivierte dendritische Zellen auf die Expression von *Lmx1b*, konnte man leider keine Expression feststellen. Die gestiegene Expression von *CD80* und *CD86* zeigte die Aktivierung des Systems und diente als Kontrolle. Lediglich aktivierte dendritische Zellen, erhalten aus einer akuten Colitis, zeigten eine sehr schwache Expression von *Lmx1b*. *Ifnb*, welches als Testgen diente, wies ebenso keine relevante Expression auf (s.a. Abb. 30).

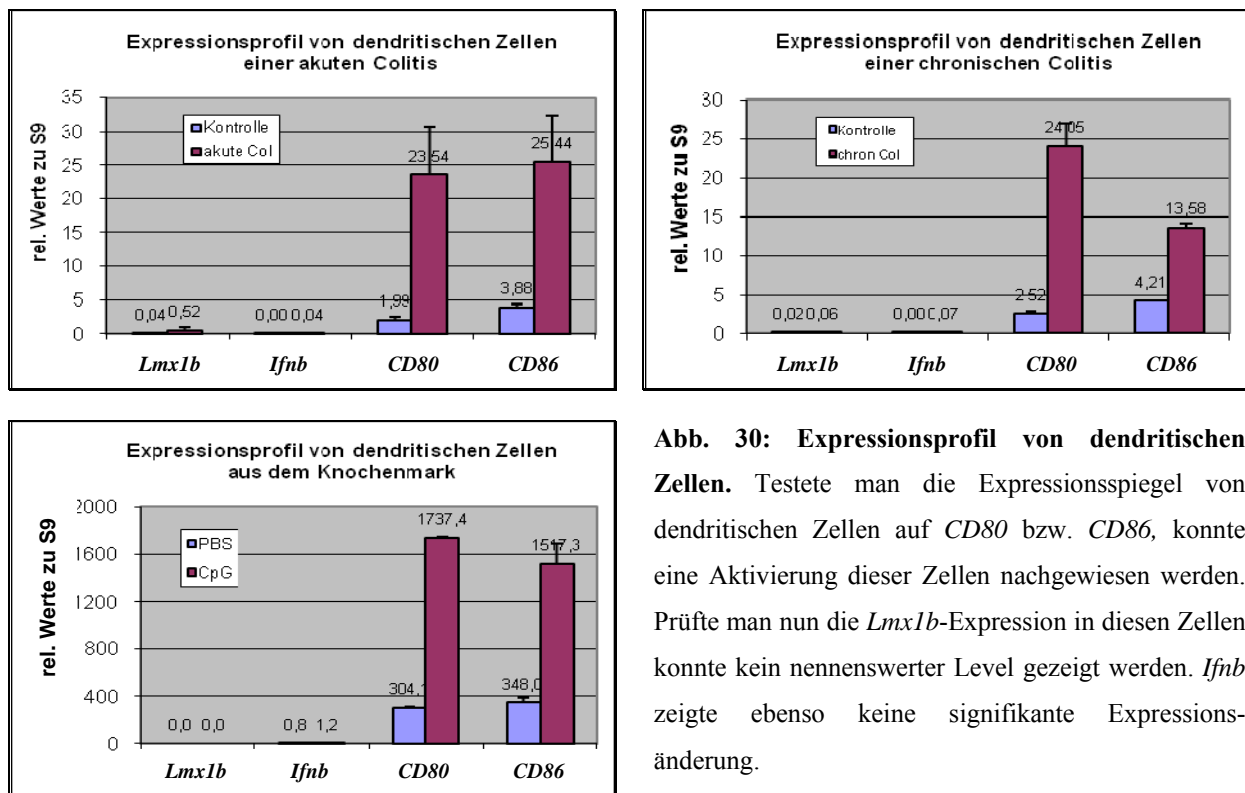


Abb. 30: Expressionsprofil von dendritischen Zellen. Testete man die Expressionsspiegel von dendritischen Zellen auf *CD80* bzw. *CD86*, konnte eine Aktivierung dieser Zellen nachgewiesen werden. Prüfte man nun die *Lmx1b*-Expression in diesen Zellen konnte kein nennenswerter Level gezeigt werden. *Ifnb* zeigte ebenso keine signifikante Expressionsänderung.

3.4.3 Makrophagen exprimieren kein *Lmx1b*

Ein weiterer Zelltyp, der in Gewebe einwandern und eine Herabregulation von Interferonen in Milz oder Thymus begründen könnte, sind Makrophagen. Um Makrophagen erhalten zu können, wurde Mäusen 1 ml PBS oder 1 ml 3% Thioglykolat intraperitoneal injiziert, um Makrophagen zu aktivieren. Nach einem bzw. sieben Tagen wurden die Mäuse getötet, mit einer Spritze 10 ml eiskaltes Medium in den Bauchraum gespritzt und daraufhin das Volumen wieder mit Hilfe einer Spritze abgesaugt. Dies wurde dann in Kultur gegeben, um die darin enthaltenen Makrophagen zu vermehren (s.a. 2.2.23 C).

Bei einer Expressionsanalyse der Makrophagen konnte keine *Lmx1b*-Expression sowohl in den mit PBS als auch in den mit Thioglykolat aktivierten Makrophagen festgestellt werden. Eine erfolgreiche Aktivierung der Makrophagen wurde mittels der gestiegenen Expressionen von *CD80* und *CD86* bestätigt (s.a. Abb. 31).

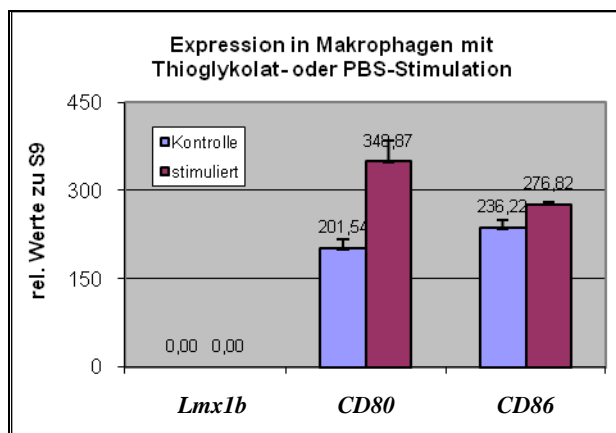


Abb. 31: Expressionsprofil von Makrophagen.

Makrophagen wurden entweder durch Thioglykolat- oder durch PBS-Behandlung stimuliert. Testete man daraufhin die beiden Makrophagen-Populationen, konnte weder vor noch nach der Stimulation eine *Lmx1b*-Expression festgestellt werden. Eine Aktivierung der Makrophagen konnte durch die gestiegene Expression von *CD80* bzw. *CD86* nachgewiesen werden.

3.4.4 Primäre Milzzellen von *Lmx1b*-Knockout Mäusen weisen eine verringerte Aktivierung von IL-6 produzierenden basophilen Granulozyten auf

Um die immunologische Relevanz von *Lmx1b* genauer beleuchten zu können, wurden ferner Milzzellen näher in Augenschein genommen. Hierfür wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mack neugeborenen konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen die Milz entfernt, diese zerkleinert und daraus eine primäre Zellkultur angelegt. Während der Kultivierung der Milzzellen wurden diese mit IL-3 stimuliert, um eine Aktivierung der

basophilen Granulozyten auszulösen. Als Kontrolle wurden nicht-stimulierte Milzzellen parallel hierzu kultiviert. Von den stimulierten und nicht-stimulierten Zellen wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA die IL-6 Konzentration gemessen (s.a. 2.2.23 B). Vergleich man nun die Konzentrationen in den Überständen der unstimulierten Zellen mit denen der stimulierten, konnte eine Abnahme der Aktivierung in heterozygoten und sehr stark in homozygoten *Lmx1b*-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen festgestellt werden. Während bei *Lmx1b*^(+/+)-Mäusen eine Zunahme der Aktivität um das 45fache zu beobachten war, konnte bei *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen nur noch eine 24fache und bei *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen sogar nur noch eine 9fache Zunahme der Aktivierung der basophilen Zellen gemessen werden (s.a. Abb. 32).

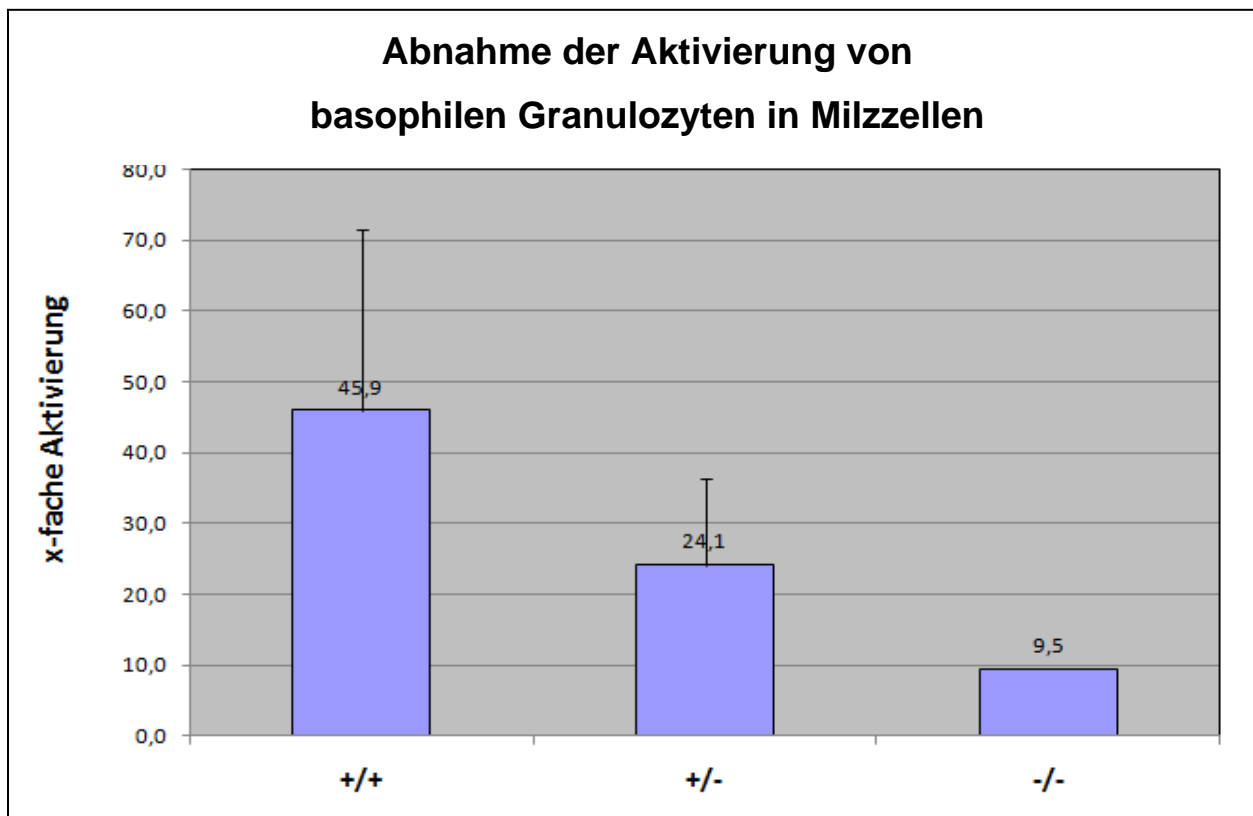


Abb. 32: Messung der Aktivierung von basophilen Granulozyten. Nach Präparation von Milzzellen und Überführung in die Zellkultur wurden basophile Zellen mittels IL-3-Gabe stimuliert, welche nun IL-6 sezernierten. Vergleich man Wildtyp Mäuse mit heterozygoten bzw. homozygoten *Lmx1b*-Knockout Mäusen, konnte eine Abnahme der IL6-Konzentration in den Mediumüberständen gemessen werden.

3.4.5 MEFs

Um den ersten Hinweisen auf eine mögliche Beteiligung von immunrelevanten Genen nachzugehen, wurden Zellen auf Interferone und Interferon-induzierbare Gene getestet. Während Anne Rascle, Tanja Neumann, Anne-Sarah Raschta und Astrid Neumann diese Gene in *Lmx1b*-überexprimierenden HeLa-Zellen erforschten, wurde sich in dieser Arbeit einer primären Fibroblasten Zellkultur aus Mäusen, auch MEFs genannt („mouse embryonic fibroblasts“), gewidmet. Diese Primärkultur hat den Vorteil, möglichst nah an den natürlichen Bedingungen zu liegen. Ebenso umging man den Nachteil, dass konventionelle *Lmx1b*-Knockout Mäuse 24 h nach der Geburt sterben, während man bei MEFs die Embryos bereits am Tag 14,5 aus dem Mutterleib entfernte und somit einem pränatalen Tod zuvorkam (s.a. 2.2.23 A).

Aus Mikroarray-Daten von LMX1B-überexprimierenden HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass Interferone sowie Interferon-induzierbare Gene höher exprimiert werden, wenn LMX1B induziert wurde. Dies konnte sowohl in einem DNA-Mikroarray als auch in der quantitativen Echtzeit-PCR gezeigt werden [Neumann, 2008]. Diese Gene sollten nun auch in den MEFs getestet werden. Nach Gewinnung der primären Fibroblasten aus den vorderen Gliedmaßen wurden diese nur bis maximal Passage 3 kultiviert, um eine Dedifferenzierung der Zellen zu vermeiden. Für weitere Analysen wurden die primären Fibroblasten auch mit verschiedenen Stimulanzien behandelt, um einen eventuellen Effekt von Interferon-induzierbaren Genen oder Interferonen selbst deutlich machen zu können. Hierbei wurden Interferon- γ (IFN- γ), Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykan und PolyI:C (Polyinosin:Polycytidylsäure) verwendet, die je nach Agens über verschiedene Toll-like Rezeptoren wirken und eine Immunantwort auslösen können.

A. Test der Expression von Toll-like Rezeptoren in MEFs

Bevor embryonale Mäuse-Fibroblasten mit unterschiedlichen Reagenzien behandelt werden konnten, musste zunächst erforscht werden, ob die jeweiligen Rezeptoren für diese in den aus Gliedmaßen gewonnenen MEFs vorhanden waren. Hierfür wurde RNA von MEFs aus Gliedmaßen von Wildtyp Mäusen präpariert und die daraus resultierende cDNA für eine anschließende Echtzeit-PCR Messung verwendet. Bei den getesteten Genen handelte es sich um „Toll-like Rezeptoren“ (TLR), die den Kontakt des Agens mit der Zelle vermitteln und somit

eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen, durch welche die Immunreaktion bewerkstelligt wird. Nach Auswertung der quantitativen Echtzeit-PCR konnte eine Expression der Toll-like Rezeptoren 1 bis 9 in MEFs nachgewiesen werden (s.a. Abb. 33).

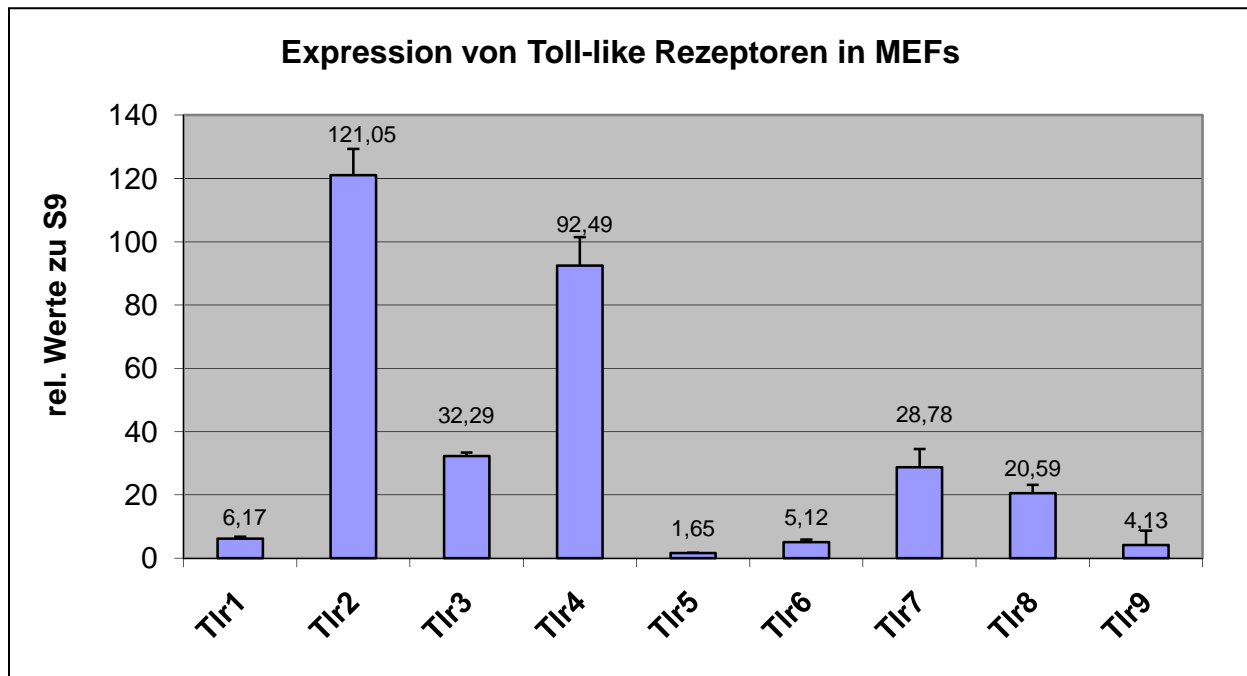


Abb. 33: Expressionsprofil von Toll-like Rezeptoren (TLR). Ehe verschiedene Reagenzien zur Immunstimulation in MEFs verwendet werden konnten, musste das Vorhandensein der jeweiligen Rezeptoren überprüft werden. Nach Präparation der RNA und der cDNA konnte in der Echtzeit-PCR das Vorhandensein aller Toll-like Rezeptoren in MEFs nachgewiesen werden.

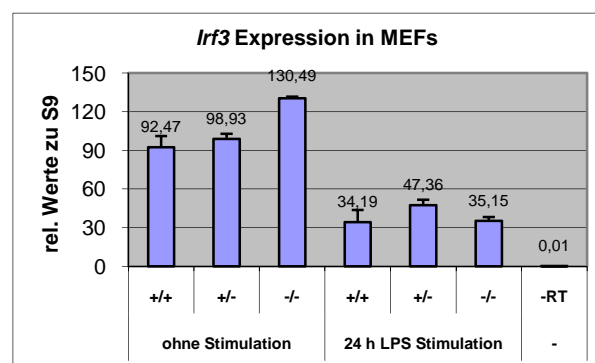
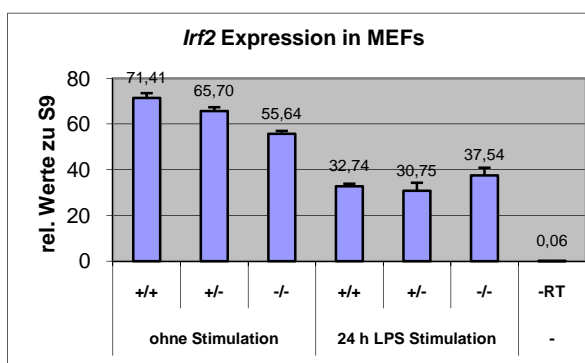
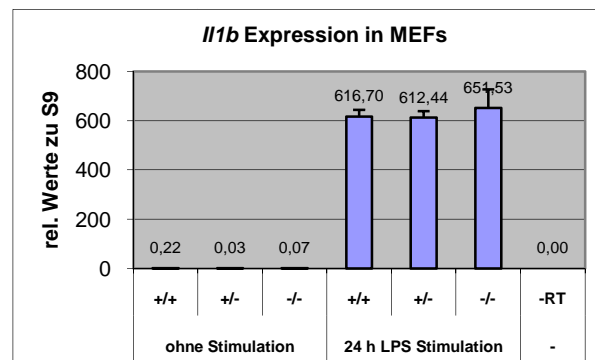
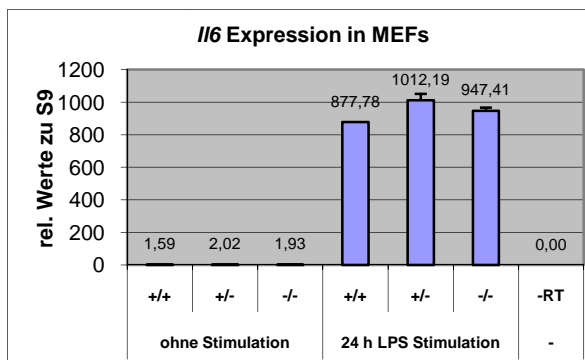
B. Untersuchung des Effekts von LPS auf MEFs

LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran von Bakterien und vermittelt eine Aktivierung des Immunsystems über den TLR 4. Für die Versuchsansätze wurden MEFs aus Gliedmaßen der Maus-Genotypen *Lmx1b*^(+/+), *Lmx1b*^(+/-) und *Lmx1b*^(-/-) verwendet, die für 24 h mit LPS stimuliert wurden. Zur Kontrolle dienten nicht-stimulierte MEFs der jeweiligen Maus-Genotypen. Nach Präparation der RNA aus diesen embryonalen Maus-Fibroblasten wurden hierauf verschiedene Gene getestet, die direkt oder indirekt von *Lmx1b* beeinflusst zu sein scheinen; hierunter befanden sich Interleukine, Interferone und Interferon-regulierte Gene [Neumann, 2008].

Wie erwartet war die Expression der Gene *Il6* oder *Il1b* nach Stimulation mit LPS stark erhöht [Ehrentraut et al., 2001], doch war hier kein Unterschied zwischen (+/+), (+/-) oder (-/-) Mäusen

bezüglich ihrer Aktivierung zu beobachten. Während allerdings bei *Irf2* allgemein eine Abnahme der Expression nach Stimulierung durch LPS zu beobachten war, konnte in der Gegenüberstellung der einzelnen Mäuse eine geringere Abnahme (32,5%) der *Irf2*-Expression in Knockout Mäusen festgestellt werden als im Vergleich zur Expressionsabnahme in Wildtyp Mäusen (54,2%). Die *Irf2*-Expression nach LPS-Stimulation war in Knockout Mäusen somit nicht so stark gefallen wie in Wildtyp Mäusen. Konträr hierzu war das Verhalten der *Irf3*-Expression. Auch hier war eine generelle Abnahme der Expression nach Induktion durch LPS zu beobachten, allerdings konnte hier eine im Verhältnis stärkere Abnahme der Expression in Knockout Mäusen (73,1%) beobachtet werden als im Vergleich zu den Kontrolltieren (60,0%). Die *Irf3*-Expression nach LPS-Stimulation scheint in *Lmx1b*-Knockout Mäusen stärker betroffen zu sein als in den vergleichbaren Wildtyp Mäusen (s.a. Abb. 34).

Besonders bemerkenswert war jedoch, dass eine gesunkene Expression von *Lmx1b* nach LPS-Stimulation festgestellt werden konnte. So nahm die Expression in *Lmx1b*^(+/+)-Mäusen um 67,7% und in *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen um 77,7% ab. Somit muss die Behandlung mit LPS und der Stimulation über TLR4 eine Signalkette beeinflusst haben, die letzten Endes *Lmx1b* reguliert, und zwar dessen Expression unterdrückt (s.a. Abb. 34). Welcher Faktor aber für diese Regulation verantwortlich ist oder ob noch weitere Signalmoleküle eine Rolle spielen, ist noch unbekannt.



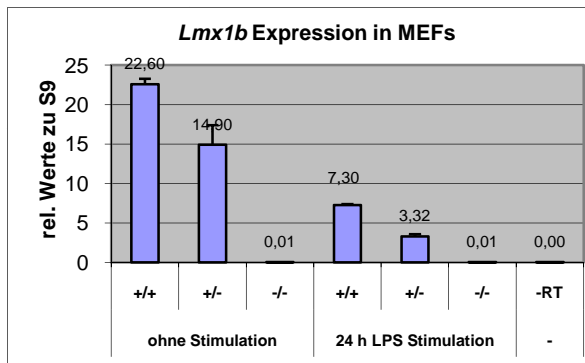


Abb. 34: Expressionsprofil in MEFs nach Stimulation mit LPS. Durch die Stimulation von MEF-Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) konnte eine erhöhte Expression von *Il6* bzw. *Il1b* gemessen werden, aber kein Unterschied im Vergleich von *Lmx1b*^(+/+)-, *Lmx1b*^(+/-)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen. Bei *Irf2* konnte allerdings ein nicht so starker Abfall der Expression, und bei *Irf3* ein wesentlich stärkerer Abfall der Expression in Knockout Mäusen als im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen beobachtet werden. Überraschenderweise wurde eine Abnahme der Expression von *Lmx1b* nach Stimulation von LPS gemessen [-RT: Probe ohne Reverse Transkriptase].

C. Untersuchung des Effekts von Interferon-γ auf MEFs

Wie schon bei LPS stimulierten Zellen wurden MEFs von Gliedmaßen aus *Lmx1b*^(+/+)-, *Lmx1b*^(+/-)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen nun durch die Gabe von Interferon-γ stimuliert, welches eine Aktivierung des Immunsystems über den Interferon-γ Rezeptor vermittelt. Zur Durchführung wurden die kultivierten MEFs für 8 h mit IFN-γ stimuliert, später geerntet und hieraus RNA und cDNA präpariert. Anschließend wurden verschiedene Gene bezüglich ihrer Expression in diesen Proben getestet. Während man bei *Ifna*, *Ifnb* und *Ifng* gar keine Expression messen konnte, wurde die Expression von *Irf2* nicht durch IFN-γ beeinflusst. Bei *Irf3* bzw. *Il10* konnte eine verminderte Expression nach Stimulation mit Interferon-γ beobachtet werden, wobei *Irf3* in Knockout Mäusen weniger betroffen ist (nur 23% Minderung) als in Wildtyp-Mäusen (47,4% Minderung). *Il10* weist annähernd keinen Unterschied zwischen Wildtyp (62,9% Minderung) und Knockout Mäusen (77,7% Minderung) auf. *Isg15*, *Irf1*, *Il6*, *Il1b* und *Stat1* zeigten generell eine höhere Expression in allen Mäusen nach Stimulation mit IFN-γ, wobei bei *Isg15*, *Irf1* und *Il6* eine schwächere Expressionssteigerung (Abnahme um 43,2% bei *Isg15*, 54,0% bei *Irf1* und 30,5% bei *Il6*) und bei *Stat1* eine stärkere Expressionssteigerung (Zunahme um 21%) in Knock-out Mäusen zu messen war als im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. *Stat1* ist dafür bekannt, die Expression von Interferon-induzierbaren Genen zu steigern. Erstaunlicherweise war auch hier eine Abnahme der *Lmx1b*-Expression in Wildtyp (45,3%) oder heterozygoten (58,4%) *Lmx1b*-Knockout Mäusen nach Stimulation mit IFN-γ zu beobachten (s.a. Abb. 35).

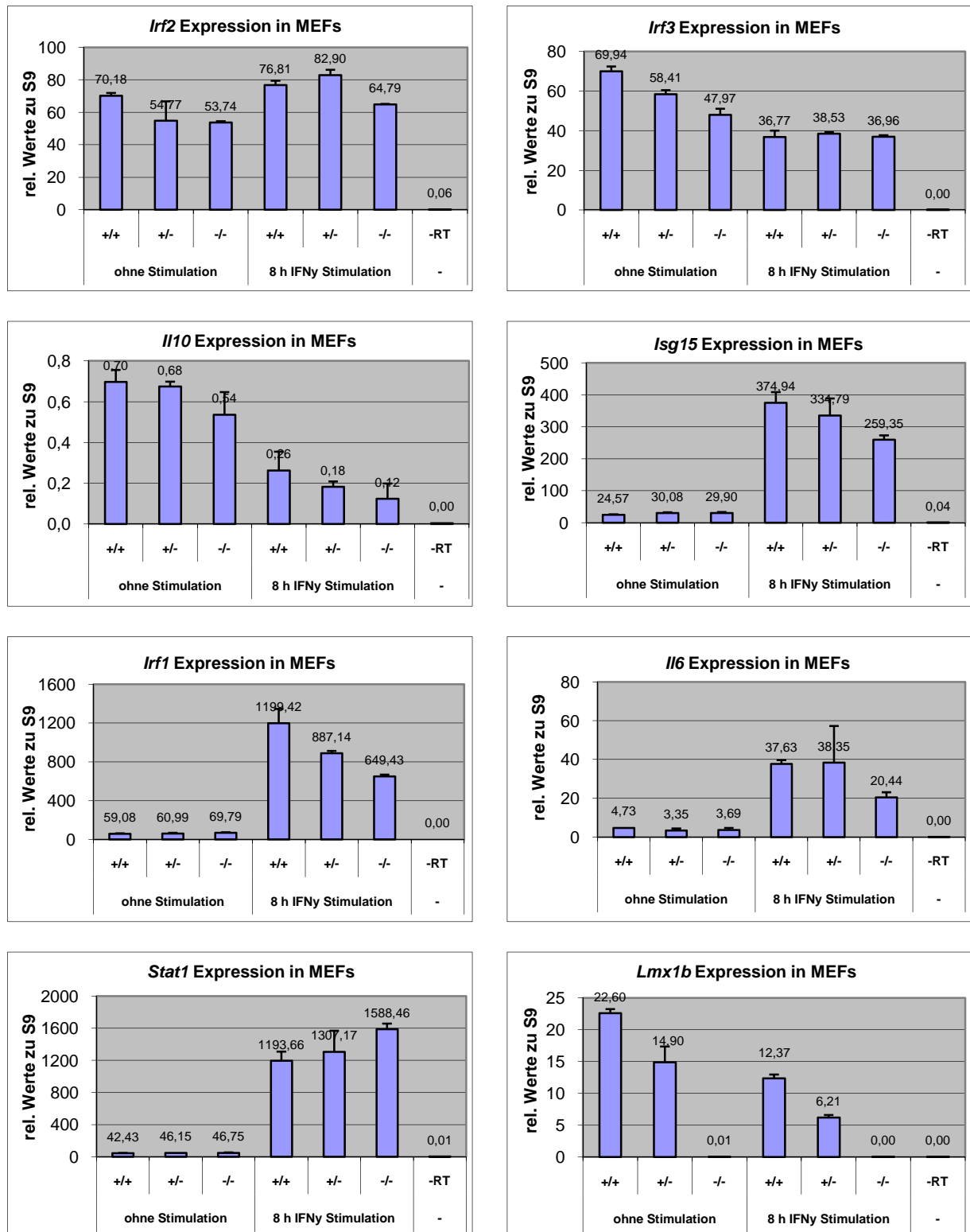


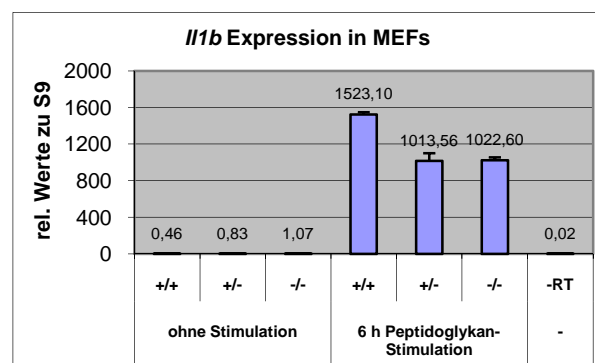
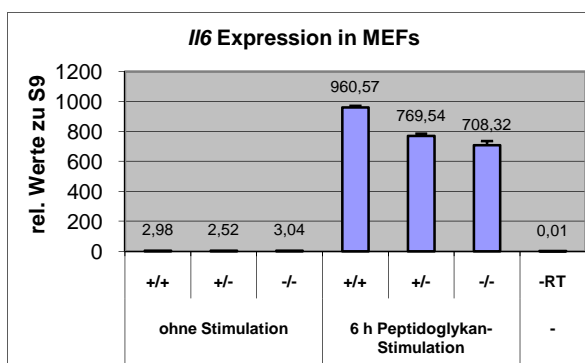
Abb. 35: Expressionsprofil in MEFs nach Stimulation mit IFN- γ . Während bei *Irf2* keine unterschiedliche Regulation in MEF-Zellen von Wildtyp oder *Lmx1b*-Knockout Mäusen nach Stimulation mit Interferon- γ zu beobachten war, konnte eine gesunkene Expression von *Irf3* und *Il10* gemessen werden, wobei die *Irf3*-Expression in Knockout Mäusen weniger beeinflusst wurde als in Wildtyp Mäusen. Bei *Isg15*, *Irf1* und *Il6* wurde ebenso ein geringerer Einfluss auf die Expression dieser Gene in Knockout Mäusen beobachtet als in Kontrollmäusen. *Stat1* zeigte hingegen eine stärkere Expression in Knockout Mäusen nach Stimulation mit IFN- γ als in Wildtyp Mäusen.

Auch hier konnte eine Abnahme der Expression von *Lmx1b* nach Stimulation mit Interferon- γ gemessen werden [-RT: Probe ohne Reverse Transkriptase].

D. Untersuchung des Effekts von Peptidoglykan auf MEFs

Peptidoglykane sind Makromoleküle, die in der Zellwand von Bakterien vorkommen und ihr so ein gewisses Maß an Festigkeit verleihen. Kommt es zu einer Infektion, binden diese Peptidoglykane an den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und vermitteln dadurch über verschiedene Adaptermoleküle die Aktivierung von NF- κ B, welches die Expression vieler immunologisch relevanter Gene induziert. Entsprechend den beiden vorherigen Versuchsansätzen sollten nun diesmal MEFs aus Gliedmaßen für 6 h mit Peptidoglykan stimuliert und die Regulation von immunrelevanten Genen von *Lmx1b*^(+/+)-, *Lmx1b*^(+/-)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen betrachtet werden.

Während die Expressionsspiegel von *Isg15*, *Irf7* und *Stat1* ein heterogenes Bild in den einzelnen Ansätzen ergaben und somit nicht weiter zu Analysen herangezogen wurden, konnte bei *Il6* und *Il1b* eine gestiegene Expression nach Stimulation mit Peptidoglykan gemessen werden. Interessanter war jedoch die Tatsache, dass beide Gene einen geringeren Anstieg der Expression in Knockout Mäusen aufwiesen als im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (Abnahme um 27,7% bei *Il6* und 71,1% bei *Il1b*). *Irf9* zeigte eine generelle Abnahme der Expression nach Stimulation mit Peptidoglykan und im Speziellen eine deutlich stärkere Abnahme der Expression (50,1%) in Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Ferner zeigte *Lmx1b* abermals eine Herabregulierung seiner Expression in *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen (72,5% bzw. 17,6%) nach Peptidoglykan-Stimulation (s.a. Abb. 36).



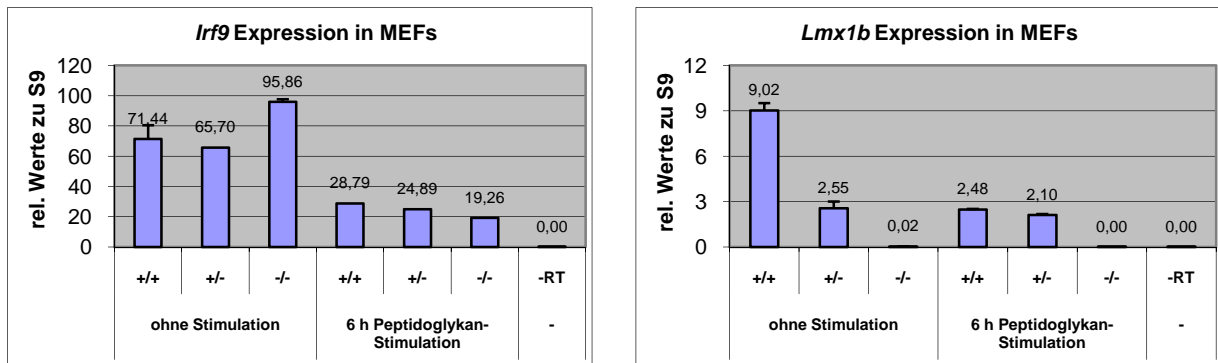


Abb. 36: Expressionsprofil in MEFs nach Stimulation mit Peptidoglykan. Sowohl bei *Il6* als auch bei *Il1b* konnte eine Expressionszunahme nach Stimulation mit Peptidoglykan beobachtet werden, allerdings fiel diese Zunahme in Knockout Mäusen geringer aus als in den Kontrollmäusen. *Irf9* zeigte eine reduzierte Expression nach Stimulation wobei hier eine viel stärkere Abnahme der Expressionsrate in Knockout Mäusen gemessen werden konnte. Wiederum konnte in *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen eine Reduzierung der *Lmx1b*-Expression nach Stimulation festgestellt werden.

E. Untersuchung des Effekts von Poly I:C auf MEFs

Das Polynukleotid „Poly I:C“ (Polyinosin:Polycytidylsäure) wird als synthetisches Analogon für doppelsträngige RNA von Viren verwendet und stimuliert die Immunantwort über den Toll-like Rezeptor 3 (TLR3). Nach 8stündiger Behandlung von MEFs aus Gliedmaßen mit diesem Reagens wurden die Zellen daraufhin geerntet, RNA und cDNA präpariert und mittels quantitativer Echtzeit-PCR die Expression immunrelevanter Gene getestet.

Sowohl bei *Il6* als auch bei *Isg15* konnte eine generelle Expressionssteigerung nach Stimulation mit Poly I:C gemessen werden. Während bei *Il6* nach Stimulation eine spezifische Zunahme der Expression in Knockout Mäusen (18,6%) zu beobachten war, konnte bei *Isg15* eine Abnahme der Expression (68,2%) in Knockout Mäusen nach Behandlung mit Poly I:C festgestellt werden. Ebenso war wiederum die *Lmx1b*-Expression in den jeweiligen Ansätzen nach Stimulation mit Poly I:C zurückgegangen: in *Lmx1b*^(+/+) um 81,4% und in *Lmx1b*^(+/-) um 87,9% (s.a. Abb. 37).

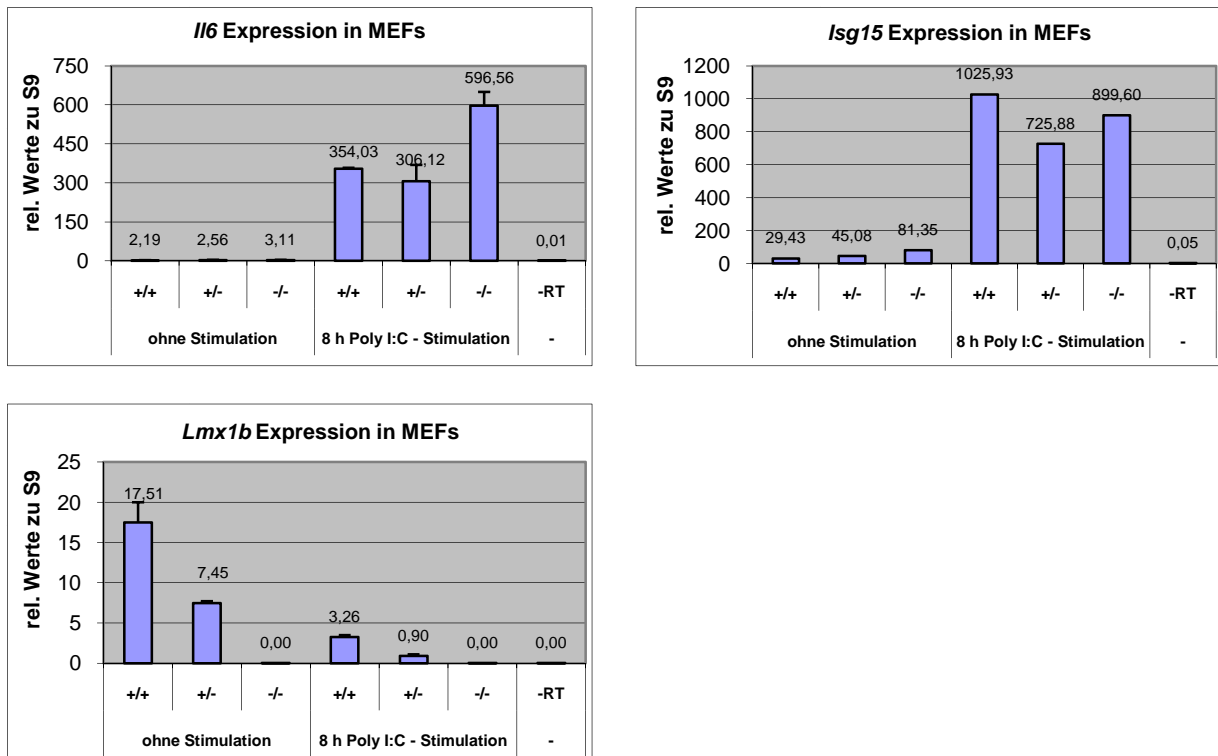


Abb. 37: Expressionsprofil in MEFs nach Stimulation mit Poly I:C. Bei *Il6* konnte eine spezifische Steigerung der Expression nach Stimulation mit Poly I:C in *Lmx1b*-Knockout Mäusen beobachtet werden, während *Isg15* eine leichte Abnahme seiner Expression in Knockout Mäusen nach Stimulation aufwies. Wiederum konnte in *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen eine Reduzierung der *Lmx1b*-Expression nach Stimulation festgestellt werden.

Durch die Verwendung von verschiedenen Reagenzien auf aus Gliedmaßen erhaltenen MEFs sollte ein Unterschied der Wirkung auf *Lmx1b*^(+/+)-, *Lmx1b*^(+/-)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen bezüglich der Expression von immunrelevanten Genen betrachtet werden. Ist *Lmx1b* in der Maus vorhanden, ist bei den Genen *Irf2* (LPS), *Irf3* (IFN- γ), *Isg15* (IFN- γ), *Irf1* (IFN- γ), *Il6* (IFN- γ), *Il6* (Peptidoglykan), *Il1b* (Peptidoglykan) und *Isg15* (Poly I:C) eine stärkere Antwort auf das Stimulans festgestellt worden als in Knockout Mäusen. Im Umkehrschluss kann man folgern, dass, sollte *Lmx1b* fehlen, in den Zellen eine veränderte Signalkaskade abläuft und folglich diese Gene weniger stark reguliert werden können. Fehlt jedoch *Lmx1b* in der Maus, ist bei den Genen *Irf3* (LPS), *Stat1* (IFN- γ), *Irf9* (Peptidoglykan), *Il6* (Poly I:C) eine stärkere Antwort auf das Stimulans beobachtet worden, woraus man schließen kann, dass *Lmx1b* einen negativ regulierenden Effekt auf diese Gene haben müsste.

Erstaunlicherweise wurde in allen Fällen der Behandlung von MEFs aus Gliedmaßen mit Stimulanzen eine Herabregulierung der *Lmx1b*-Expression beobachtet. Dies kann nur insofern darin begründet sein, dass nach der Aktivierung der Immunabwehr die Expression von *Lmx1b* gehemmt wird.

3.4.6. Mikroarray-Analyse von Genen mit Relevanz für die Immunregulation

Daten von Tanja Neumann [Dissertation, 2008] und Anne-Sarah Raschta [Dissertation, 2009] deckten eine Regulation von Interferon-induzierbaren Genen, Interferonen und Zytokinen durch LMX1B in HeLa-Zellen auf. Hierbei konnte sowohl die Beteiligung des Interferon-beta-Signalweges gezeigt als auch eine Regulation von NF- κ B Zielgenen bewiesen werden. Um weitere Kandidatengene, die in die Regulation und Steuerung der Immunantwort eingreifen können, aufzudecken, wurden Daten eines Mikroarrays von konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen mit Schwerpunkt bezüglich der Immunrelevanz ausgewertet.

Durch Inaktivierung von *Lmx1b* in Nieren von konventionellen Knockout Mäusen wurden 40 Gene reguliert (38 heraufreguliert, 2 herunterreguliert), die einen Einfluss auf die Immunregulation und -vermittlung haben. Eine Zusammenfassung dieser Gene wird in Tabelle 14 dargestellt:

<i>Symbol</i>	<i>Name</i>	<i>Regulation in Ko Mäusen</i>
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	6,14x ↑
Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	4,87x ↑
Ccr5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	3,88x ↑
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	8,71x ↑
Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2,50x ↑
Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	2,62x ↑
Gbp2	Guanylate nucleotide binding protein 2	2,62x ↑
Gbp4	Guanylate nucleotide binding protein 4	4,10x ↑
Gvin1	GTPase, very large inducible protein 1	3,47x ↑
Ifi204	Interferon activated gene 204	2,46x ↑
Ifi205	Interferon activated gene 205	2,33x ↑
Ifi27	Interferon, alpha-inducible protein 27	4,16x ↑
Ifih1	Interferon induced with helicase C domain 1	2,86x ↑
Ifit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	6,33x ↑
Ifit3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	3,01x ↑
Ifrd1	Interferon-related developmental regulator 1	2,61x ↑
Il10	Interleukin 10	3,59x ↑
Il12b	Interleukin 12 beta	3,30x ↑
Il1b	Interleukin 1 beta	4,92x ↑
Il1r2	Interleukin 1 receptor, type II	5,73x ↑
Il31ra	Interleukin 31 receptor A	2,98x ↑

Irak3	Interleukin-1 receptor-associated kinase 3	4,56x ↑
Irf7	Interferon regulatory factor 7	4,93x ↑
Irgm	Immunity-related GTPase family, M	2,13x ↑
Isg15	Interferon stimulated protein 15	6,12x ↑
Isgf3g = Irf9	Interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma	2,28x ↑
Itk	Interleukin-2 inducible T-cell kinase	3,04x ↓
Mx1	Myxovirus resistance 1	3,73x ↑
Mx2	Myxovirus resistance 2	3,65x ↑
Oas1a	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A	3,16x ↑
Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	4,19x ↑
Osmr	Oncostatin M receptor	5,06x ↑
Ptges	Prostaglandin E synthase	2,32x ↓
Ptx3	Pentraxin related gene	2,32x ↑
Rtp4	Receptor transporter protein 4	3,77x ↑
Socs3	Suppressor of cytokine signaling 3	2,60x ↑
Socs7	Suppressor of cytokine signaling 7	3,91x ↑
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	2,28x ↑
Stat2	Signal transducer and activator of transcription 2	2,34x ↑
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3	2,43x ↑

Tab. 14: Aufstellung von Genen, die an der Vermittlung der Immunantwort oder deren Regulation beteiligt sind und bei konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen in der Niere signifikant reguliert wurden.

Stellt man diese Ergebnisse den bisherigen Ergebnissen aus früher durchgeführten Arrays gegenüber, zeigte sich eine unterschiedliche Regulation dieser Gene in den einzelnen Systemen. Während übereinstimmend Arrays von ganzen Nieren von konventionellen *Lmx1b*-Knockout-Mäusen eine Heraufregulation von Interferon-regulierten Genen oder auch NF-κB-Zielgenen durch *Lmx1b* ergaben [Neumann, 2008], wurde diese Gruppe von Genen in Glomeruli-Präparationen von induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen herabreguliert [Schaffer, 2011]. Dies konnte auch in HeLa-Zellen mit LMX1B-Überexpression beobachtet werden [Prestel, 2003] (s.a. Tab. 15).

cDNA-Array von LMX1B-exprimierenden Zellen am DKFZ in Heidelberg [Prestel, 2003]	Affymetrix-Mikroarray von neugeborenen <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäusen am ZMF in Heidelberg [Neumann, 2008]	Filter-cDNA-Array von neugeborenen <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäusen am DKFZ in Heidelberg [Neumann, 2008]	Affymetrix-Mikroarray von Glomeruli von Podozyten-spezifischen <i>Lmx1b</i> -Knockout Mäusen am KFB in Regensburg [Schaffer, 2011]
G1P3 ↑	H2-Aa ↑	Cxcl10 ↑	Ccl3 ↓
IFI16 ↑	Ifi1 ↑	Ifi47 ↑	Cd244 ↓
IFI44 ↑	Ifi47 ↑	Ifi203 ↑	Cd44 ↓
IFIT1 ↑	Ifi203 ↑	Ifit3 ↑	Cd86 ↓
IFITM1 ↑	Ifit1 ↑	Ifitm3 ↑	Clec4a3 ↓
IFITM2 ↑	Igtp ↑	Ifnar2 ↑	Cxcl10 ↓
IFITM3 ↑	Irf1 ↑	Il6st ↑	Cxcl2 ↓
ISG15 ↑	Isgf3g (=Irf9) ↑	Irf2 ↑	Fcgr1 ↓
	Oas1a ↑	Irf2bp ↑	Fcgr3 ↓
	Serping1 ↑	Irf3 ↑	Fcgr4 ↓
	Stat1 ↑	Isgf3g (=Irf9) ↑	Hspa1a ↓
	Tor3a ↑	Osmr ↑	Hspa1b ↓
		Tor3a ↑	Ifi202b ↓
			Il10 ↓
			Irg1 ↓
			Pilra ↓
			Pbp (=Cxcl7) ↓
			Rgs1 ↓
			Tlr7 ↓
			Trem14 ↓

Tab. 15: Darstellung von Interferon-regulierten Genen und NF-κB-Zielgenen aus bisherigen Mikroarrays.

Vergleicht man die einzelnen Gene dieser Arrays miteinander, konnte zumindest eine Auffälligkeit bezüglich einiger Gene ausgemacht werden. So wurden die Gene *Cxcl10*, *Ifi1*, *Ifi3*, *Irf9* (= *Isgf3g*), *Oas1a*, *Osmr* und *Stat1* in Gesamtnieren-Präparationen von konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen übereinstimmend hochreguliert. Dass die Regulation in HeLa-Zellen genau konträr verläuft kann darin liegen, dass verschiedene modifizierende Regulatorgene vorhanden sind, die in diesem System aktiv sind. Bei den induzierten Podozyten-spezifischen Knockouts kann es in zeitlich oder entwicklungsbedingt verschieden aktiven Regulatorgenen begründet sein.

3.4.7 Mäuse mit heterozygotem *Lmx1b*-Verlust zeigen eine stärkere Reaktion auf ein gegen die glomeruläre Basalmembran gerichtetes Serum als Wildtyp Mäuse

Nicht veröffentlichte Daten von Vorversuchen mit *Lmx1b*-Knockout Mäusen zeigten einen möglichen Zusammenhang eines Immundefekts und der Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran bei *Lmx1b*-Knockout Tieren. Da aber homozygote Knockout Tiere schon innerhalb von 24 h nach der Geburt sterben und heterozygote Mäuse keinen offensichtlichen Schaden diesbezüglich aufweisen, wurde nun versucht, mittels gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) gerichteten Antikörpern einen eventuellen Unterschied in der Immunantwort zwischen *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen deutlich zu machen.

Um eine Nierenschädigung auszulösen, wurden beide Versuchsgruppen [*Lmx1b*^(+/+), n=14; *Lmx1b*^(+/-), n=13] zunächst vor Versuchsbeginn mit Kaninchen IgG immunisiert und 6 Tage später das anti-GBM-Serum injiziert (s.a. 2.2.22). Von nun an wurde alle zwei Tage der 24 h Urin der einzelnen Mäuse in Stoffwechselkäfigen gesammelt und über einen Zeitraum von 10 Tagen die Bildung einer Proteinurie beobachtet. Nach Messungen der Proteinkonzentrationen in den Urinproben konnte keine Bildung einer Proteinurie in herkömmlichen *Lmx1b*^(+/+)-Mäusen gemessen werden, hingegen bildeten heterozygote *Lmx1b*-Knockout Mäuse sechs Tage nach Injektion der Antiserums eine Proteinurie, welche bis zum zehnten Tag weiter anstieg. Allerdings zeigten die Mäuse dieser Gruppe ein heterogenes Krankheitsbild, welches von keiner bis hin zu sehr starker Proteinurie reichte (s.a. Abb. 38). Ein Student's t-Test von Werten vom Tag 10 der einzelnen Mäuse ergab keine signifikante Ausbildung der Proteinurie (p = 0,061), was aber in der geringen Anzahl an Versuchsmäusen zu begründen sein dürfte. Eine größere Anzahl an Mäusen in der jeweiligen Versuchsgruppe könnte dieses Problem beheben.

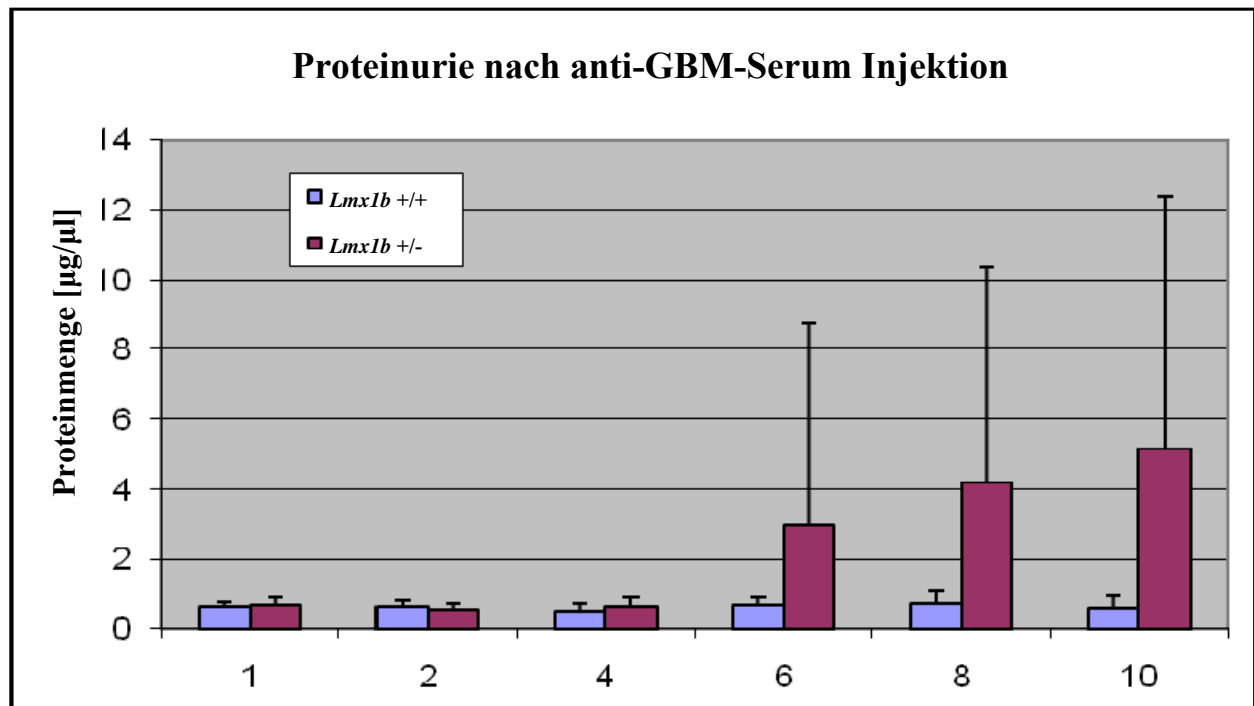


Abb. 38: Bildung einer Proteinurie nach Injektion eines Anti-GBM-Serums. *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen wurden Antikörper injiziert, die gegen die GBM gerichtet waren. Messungen von 24 h Urinproben, die alle zwei Tage genommen wurden, ergaben eine Proteinurie in heterozygoten Mäusen nach 6 Tagen, nicht aber in Wildtyp Mäusen. Diese Proteingehalte stiegen auch noch bis zum Versuchsende nach 10 Tagen. Allerdings entwickelten auch einige heterozygote Mäuse keine Proteinurie.

4. Diskussion

4.1 Einführung

Mutationen in *LMX1B* verursachen das sogenannte Nagel-Patella-Syndrom, eine seltene autosomal-dominant vererbte Erbkrankheit, welche u.a. durch dysplastische Nägel, fehlender oder hypoplastischer Kniescheiben, primäres Offenwinkelglaukom und chronische Nephropathie charakterisiert ist [Sweeney et al., 2003]. Neben seiner Beteiligung bei vielen entwicklungsspezifischen Vorgängen, wie z.B. der Gliedmaßenentwicklung entlang der dorsoventralen Achse [Chen et al., 1998], wird bei Patienten mit renaler Schädigung auch eine verdickte glomeruläre Basalmembran mit fibrillären Einschlüssen und unregelmäßigen Aufhellungen beobachtet [Ben-Bassat et al., 1971; del Pozo & Lapp, 1970]. Ebenso kann auch ein Verlust der Schlitzmembran und der Fußfortsätze der Podozyten festgestellt werden [Rohr et al., 2002; Morello et al., 2001].

Zum besseren Verständnis dieser Erkrankung wurde eine konventionelle *Lmx1b*-Knockout Maus entwickelt, die zur Aufklärung des Krankheitsverlaufs und ihrer Entstehung beitragen sollte [Chen et al., 1998]. Untersuchte man homozygote *Lmx1b*-Knockout Mäuse, welche keine Fußfortsätze und keine Schlitzmembran entwickelten, fiel die Tatsache auf, dass diese Mäuse bereits 24 h nach der Geburt starben, während heterozygote Knockout Mäuse offensichtlich gesund erschienen. Dies steht im Gegensatz zum dominanten Verlauf bei Patienten, die bereits mit einem defekten *LMX1B*-Allel am Nagel-Patella-Syndrom erkranken. Während Podozyten von homozygoten Knockout Mäusen keine Expression von *Nphs2*, *Col4a3* und *Col4a4* aufwiesen [Miner et al., 2002], waren diese Gene bei Patienten nicht betroffen [Heidet et al., 2003]. Aufgrund dieser Gegensätze zwischen Maus und Mensch wurde ein weiteres Maussystem entwickelt, welche diese Differenzen umgehen sollte: die konstitutive Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Maus. Diese Mäuse entwickelten fünf Tage nach der Geburt eine Proteinurie und starben nach 14 Tagen aufgrund einer massiven Nierenschädigung. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine schwere Schädigung der renalen Struktur mit Verlust der Schlitzmembranen und Fußfortsätzen oder einer verdickten GBM. Bemerkenswert war, dass diese Mäuse eine normale Expression von *Nphs2*, *Col4a3* und *Col4a4* aufwiesen und somit ein Krankheitsbild entsprechend von Patienten zeigten [Suleiman et al., 2007]. Die Tatsache, dass kurz nach der Geburt noch keine größeren Veränderungen in Podozyten entdeckt werden konnten, deutete auf eine mögliche Beteiligung von *Lmx1b* nicht nur bei der Entwicklung der Podozyten hin, sondern auch auf einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der renalen Struktur. Dies gab Anlass zur

Entwicklung einer induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Maus und zur Untersuchung der Rolle von *Lmx1b* in der Aufrechterhaltung der podozytären Struktur.

4.2 Charakterisierung induzierbarer Podozyten-spezifischer *Lmx1b*-Knockout Mäuse

4.2.1 Induzierte Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Mäuse entwickeln eine heftige Proteinurie

Um die Funktion von *Lmx1b* in adulten Mäusen näher erforschen zu können, musste der Umstand umgangen werden, dass konventionelle *Lmx1b*-Knockout Mäuse bereits 24 h nach der Geburt sterben oder dass konventionelle Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Mäuse nur bis zu 14 Tage überleben können. So wurde durch Kreuzungen dreier Mauslinien (*Lmx1b*^{lox/+}; LC-1; P2.5-rtTA) eine neue dreifach-transgene Mauslinie entwickelt, in welcher man *Lmx1b* spezifisch in den Podozyten zur gewünschten Zeit ausschalten konnte. Diese Mäuse (lox/lox; rtTA; Cre) entwickelten sich zunächst entsprechend normaler Wildtyp Mäuse, doch konnte nun durch die Gabe von Doxyzyklin in das Trinkwasser eine Rekombination in *Lmx1b* erzeugt und somit seine Inaktivierung erzwungen werden. Dass tatsächlich eine Rekombination in *Lmx1b* nach Doxyzyklin-Gabe stattfindet, konnte durch Präparation von DNA aus den jeweiligen Nieren bewiesen werden. Mit Hilfe einer *Lmx1b*-spezifischen PCR konnte ein verkürztes *Lmx1b*-Fragment festgestellt werden, was wiederum auf eine erfolgreiche Rekombination rückschließen lässt. Auch konnte man hier noch eine Bande mit nicht-rekombiniertem *Lmx1b* erkennen, was auf eine nicht vollständige Inaktivierung von *Lmx1b* hinweist (s.a. 3.1.1). Dies könnte in dem Umstand begründet sein, dass die einzelnen Mäuse unterschiedlich viel Trinkwasser mit Doxyzyklin aufnehmen oder unterschiedlich verstoffwechseln. Ebenso zeigten Analysen sowohl von doppelt-transgenen Mäusen als auch von dreifach-transgenen Mäusen ohne Doxyzyklin-Gabe, dass es hier zu keiner Induktion des Knockouts gekommen war, was wiederum für die Verwendung dieses Systems spricht. Die Tatsache, dass man nun ein weiteres funktionsfähiges zeit- und gewebespezifisches Knockout Modell zur Verfügung hat, macht dies zu einem nützlichen Werkzeug für weitere Forschungen [Eremina et al., 2008; Juhila et al., 2006].

Im Falle eines induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockouts konnte ein erstes Auftreten einer Proteinurie nach 7 Tagen festgestellt werden; in Einzelfällen war eine schwache Proteinurie

rie schon nach 6 Tagen messbar, was eventuell auf eine vermehrte Aufnahme von Trinkwasser mit Doxyzyklin zurückzuführen ist. Diese Proteinurie wurde durch Coomassie gefärbte Gele bzw. Bradford-Messungen erkannt (s.a. 3.1.2). Erstaunlich war, dass die Proteinurie schon nach einer Woche einen sehr hohen Wert erreicht hatte, welcher in der Folgezeit nur noch leicht anstieg. Aufgrund der Schwere der Erkrankung müsste man annehmen, dass die Mäuse bald darauf sterben würden, was aber nicht der Fall war. Auch ein Gewichtsverlust war nicht zu beobachten. Eine mögliche Erklärung könnte darin zu finden sein, dass nach Doxyzyklingabe nicht alle Glomeruli gleichermaßen betroffen sind, da in Strukturaufnahmen (s.a. 3.1.3, 3.1.4 und 3.1.5) immer noch intakte Glomeruli zu finden waren. Dies kann in einer mosaikartigen Aktivität des *NPHS2*-Promotors begründet sein. Ging man bisher davon aus, dass *Lmx1b* vorwiegend an Vorgängen der Entwicklung involviert ist, musste man jetzt feststellen, dass *Lmx1b* auch an der Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere beteiligt ist. Entsprechend diesen Ergebnissen konnte auch Suleiman et al. 2007 anhand von Beobachtungen an konventionellen Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen eine Beteiligung von *Lmx1b* an der Aufrechterhaltung der renalen Struktur annehmen.

4.2.2 Keine gravierenden renalen Schäden nach Bildung einer frühen Proteinurie erkennbar, allerdings nach längerer Beobachtung

Untersuchte man induzierbare Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Mäuse sofort nach Entstehung einer Proteinurie, konnte man keine gravierenden Schäden der Niere feststellen. Sowohl in lichtmikroskopischen als auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten keine schwerwiegenden strukturellen Veränderungen ausgemacht werden, nur gelegentliche Verluste der Fußfortsätze der Podozyten waren zu beobachten (s.a. 3.1.3 und 3.1.4). Da aber zu diesem Zeitpunkt die Proteinurie schon hoch war, war diese Erscheinung überraschend, nahm man doch eine massive Schädigung der Niere an. Eine Möglichkeit könnte darin bestehen, dass zwar noch keine strukturellen, aber schon funktionelle Defizite vorhanden waren. So würden Podozyten zwar noch an der GBM aufliegen, der molekulare Kontakt könnte aber schon gestört sein und die Ursache für die heftige Proteinurie sein. Betrachtet man Aufnahmen von 4 Wochen behandelten Mäusen, kann auch ein weitflächiger Verlust der Podozyten beobachtet werden.

Auch eine Analyse von Podozyten-spezifischen Proteinen (Nephrin, Podocin, Wt1, Kollagen IV $\alpha 4$) mittels immunhistologischer Färbungen zeigte keine Abnahme der Signale zu diesem Zeit-

punkt. Dies könnte in einer langsamen Degradation jener Proteine begründet sein oder darin, dass *Lmx1b* gar nicht für deren Aufrechterhaltung in vollständig differenzierten Podozyten, sondern nur für deren Synthese in sich entwickelnden Podozyten notwendig ist. Diese Beobachtung konnte bereits bei konventionellen Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen gemacht werden, bei welchen ebenso eine normale Färbung für Kollagen IV $\alpha 3$, Kollagen IV $\alpha 4$, Neph-
rin, Podocin, Cd2ap, Wt1 oder α -Actinin 4 festgestellt werden konnte, obwohl diese Mäuse nach ca. 2 Wochen starben [Suleiman et al., 2007].

Betrachtete man die Mäuse über einen längeren Zeitraum nach Inaktivierung von *Lmx1b* (bis zu 4 Wochen), konnte eine Zunahme der renalen Schädigung mit weitreichendem Verlust der Fußfortsätze, nackter GBM, spinnenähnlichen Ausbildungen der Podozyten und großen Ansammlungen von Protein in den Tubuli diagnostiziert werden (s.a. 3.1.4). Dieses Erscheinungsbild ging mit einem Verlust der Färbung Nieren-spezifischer Proteine einher, was wohl allerdings ein sekundärer Effekt ist. Überraschenderweise war die Färbung von Kollagen IV $\alpha 4$ selbst nach vierwöchiger Induktion des Knockouts vollständig, was durch einen sehr langsamen Abbau von Kollagen IV $\alpha 4$ erklärt werden kann (s.a. 3.1.5). Auch konnten in allen Tieren einzelne intakte Glomeruli oder intakte Bereiche von beschädigten Glomeruli gefunden werden, was wohl auf eine nicht vollständige Rekombination von *Lmx1b* in allen Zellen zurückzuführen ist. Nach wie vor hatte man aber noch immer keine Begründung für die frühe Bildung einer Proteinurie ohne offensichtlichen Nierenschaden.

4.2.3 Podozyten gehen aufgrund von Apoptose verloren

Zur weiteren Untersuchung der Vorgänge in Podozyten nach Inaktivierung von *Lmx1b* wurden diese mittels eines Apoptose-Nachweises mit fluoreszenzmarkiertem dUTP behandelt. In der Tat konnte bei Podozyten mit induziertem *Lmx1b*-Knockout das Auftreten von Apoptose nach einer Woche Induktion festgestellt werden, während bei Kontrollmäusen keine Färbung zu beobachten war (s.a. 3.1.7). Fraglich war nun, ob die beobachtete Apoptose auf einer direkten Regulation durch *Lmx1b* beruht, also *Lmx1b* Faktoren der Apoptose-Signalkaskade reguliert, oder ob die beobachtete Apoptose auf sekundäre Effekte zurückzuführen ist, welche aus einer anderweitigen Schädigung der Podozyten resultieren und diese daraufhin den programmierten Zelltod durchlaufen.

Für ersteres wurden Expressionsanalysen Apoptose-regulierender Gene in Nieren von konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen durchgeführt (s.a. 3.1.8). In diesen Proben konnten 15 Gene herausgefiltert werden, von welchen in der Literatur bekannt war, dass sie die Apoptose beeinflussen. Von diesen potentiellen Kandidaten wurden einige Gene ausgewählt, deren Expression in Nierenproben von induzierbaren Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen getestet werden sollte. In der Tat konnte bei zwei Genen, *Tnfrsf9* und *Bcl2l1l*, eine Erhöhung der jeweiligen Expression in einwöchig induzierten Mäusen festgestellt werden. Ebenso konnte für *FasL* und nochmals *Tnfrsf9* eine erhöhte Expression in Mäusen mit zweiwöchiger Induktion des Knockouts gezeigt werden. Eine Heraufregulation von Apoptose-induzierten Genen könnte das Auftreten von Apoptose von Podozyten erklären; unklar ist allerdings noch, ob dies wiederum auf sekundäre Effekte beruht oder ob *Lmx1b* direkt oder indirekt diese Gene reguliert. In diabetischer Nephropathie konnte bereits eine Heraufregulation von *Bcl2l1l* durch den Transkriptionsfaktor „Forkhead Box O4“ (Foxo4) nachgewiesen werden, woraufhin es zu einer reduzierten Anzahl von Podozyten durch Apoptose gekommen war [Chuang et al., 2011]. In HIV-assoziiierter Nephropathie konnte eine gestiegene Expression von *FasL* gemessen werden, welche, vermittelt durch NF- κ B, zu einer erhöhten Apoptoserate von Podozyten führte [Ross et al., 2005]. Sollte *Lmx1b* diese Gene direkt regulieren, müsste dies ein Chromatin-Immunpräzipitations-Test (CHIP) oder ein Luciferase-Reporter-Assay bestätigen können. Solche Nachweise wurden aber im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt. Möchte man indirekte oder sekundäre Effekte untersuchen, müssten noch weitreichendere Versuche mit Analysen von mehreren Genen oder Signalwegen durchgeführt werden.

Apoptose in Podozyten ist inzwischen weit untersucht. So konnte Ren et al. (2011) zeigen, dass eine durch Angiotensin II induzierte Dephosphorylierung von Nephrin zu Apoptose von Podozyten führt. Ebenso führt eine hohe Konzentration von Albumin zu einer Steigerung der Konzentration an intrazellulärem Calcium, vermittelt durch TRPC6-Kanäle, was wiederum in Apoptose der Podozyten resultiert [Chen et al., 2011]. Beim sog. Alport Syndrom, einer renalen Erkrankung mit Störung der glomerulären Basalmembran (Typ IV Kollagen) und einem Verlust der Podozyten, konnte eine gesteigerte Synthese von TNF- α in Podozyten gezeigt werden, welche Apoptose begangen. Wurde dieser pro-apoptotische Faktor durch einen Antagonisten gehemmt, wurden weniger apoptotische Podozyten ausgezählt [Ryu et al., 2011]. Da man für beide Szenarien (direkte oder indirekte Regulation) Beispiele der Auslösung von Apoptose von Podozyten finden kann, lässt es sich auch in unserem Beispiel nicht ausschließen, dass *Lmx1b* entweder

über eine direkte Regulation eines apoptotischen Faktors oder als indirektes Ereignis nach Verlust der intakten Nierenstruktur für die Apoptose der Podozyten verantwortlich ist.

4.3 Aufklärung des Einflusses von Lmx1b an der Aufrechterhaltung der podozytären Struktur

Da man keine auffälligen Veränderungen der renalen Struktur nach einer Woche Induktion in Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen feststellen konnte und auch keine Modifikationen von Proteinen der Schlitzmembran oder der GBM nachzuweisen waren, richtete sich unser Augenmerk nun auf die Organisation der Zell-Matrix-Kontakte bzw. des Aktin-Zytoskeletts. So führt eine Inaktivierung der Integrine $\alpha 3$ und $\beta 1$ zu einem Verlust der Fußfortsätze der Podozyten mit Bildung einer Proteinurie [Kanasaki et al., 2008; Kreidberg et al., 1996]. Da Integrine mit dem Aktin-Zytoskelett verankert sind, könnte auch eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zu einem Verlust der Podozyten führen. Beeinträchtigungen von z.B. α -Actinin-4 oder auch Synaptopodin resultieren in einem Verlust der Podozyten und damit einem Auftreten von Proteinurie [Kaplan et al., 2000; Huber et al., 2006]. Mit Hilfe von verschiedenen Assays sollten mögliche Einflüsse von Lmx1b auf die Verankerung der Podozyten bzw. der Organisation des Zytoskeletts aufgedeckt werden.

4.3.1 Zellen ohne LMX1B zeigen eine höhere Motilität als mit LMX1B

Erste Anhaltspunkte auf der Suche nach dem Grund für den Verlust von Podozyten sollten über einen sog. „Scratch-Assay“ erhalten werden, bei welchem konfluente Zellen mit einem Spatel abgelöst wurden und die Einwachsgeschwindigkeit von LMX1B-produzierenden Zellen mit der von nicht LMX1B-produzierenden Zellen verglichen wurde. Hier stellte sich heraus, dass ohne LMX1B die Zellen viel schneller diese künstlich verursachte Lücke schließen konnten als mit LMX1B; diese Beobachtung konnte man sowohl bei HeLa- als auch bei LLC-PK₁-Zellen machen (s.a. 3.2.2). Ferner zeigte ein Motilitätstest über 8 Stunden, bei welchem die zurückgelegten Strecken von LMX1B-produzierenden mit nicht LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen verglichen wurden, dass Zellen ohne LMX1B eine signifikant weitere Strecke zurückgelegt hatten als ihre Vergleichszellen (s.a. 3.2.3). Diese Ergebnisse bestätigte auch noch ein weiterer Versuch mit primären Podozyten aus einwöchig-induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout

Mäusen. Hierbei wurden nach Induktion des Knockouts die Glomeruli aus den jeweiligen Mäusen präpariert und in mit Fibronektin beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Auffallend war an dieser Stelle, dass nach Durchsicht der Zellkulturschalen merklich mehr Podozyten aus den Glomeruli von induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen ausgewachsen waren als von Kontrollmäusen mit normaler *Lmx1b*-Expression. Eine darauffolgende genaue Auszählung von mehreren Ansätzen brachte eine signifikant höhere Anzahl an ausgewachsenen Podozyten mit induziertem *Lmx1b*-Knockout als im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ans Licht (s.a. 3.2.1). Auch hier konnte somit wieder bestätigt werden, dass ohne *Lmx1b*-Expression die Zellen eine höhere Motilität aufwiesen als mit *Lmx1b*-Expression. Eine höhere Motilität von Zellen ohne *Lmx1b/LMX1B* ist somit unstrittig. Unklar war zu diesem Punkt allerdings immer noch, ob dies auf einer fehlerhaften Organisation des Aktin-Zytoskeletts beruht und die Zellen somit beweglicher sind, oder ob eine verminderte Adhäsion der Podozyten an ihrer Oberfläche der ausschlaggebende Punkt für die gestiegene Motilität der Zellen ist.

Besonderes Augenmerk wurde auch auf die Möglichkeit gelegt, dass eine erhöhte Motilität durch eine Änderung des Membranpotentials hervorgerufen werden könnte. So zeigen verschiedene Typen von Zellen, wie z.B. Fibroblaten, Lymphozyten oder Epithelzellen, eine verminderte Motilität nach Aktivierung oder Blockierung von Kaliumkanälen [Schwab et al., 2008]. Untersuchungen hierzu an Podozyten, die nach einer Glomeruli-Präparation von für eine Woche induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen gewonnen wurden, zeigten keine Veränderungen des Membranpotentials im Vergleich zu Podozyten von Kontrollmäusen. Hierbei wurden sowohl noch am Glomerulum anhaftende Podozyten als auch passagiierte Podozyten untersucht (s.a. 3.2.6). Somit kann ein verändertes Membranpotential als Ursache für die beobachtete gestiegene Motilität von Zellen ohne *Lmx1b*-Expression ausgeschlossen werden.

4.3.2 Keine Veränderungen der Organisation des Aktin-Zytoskeletts ohne LMX1B feststellbar

Um die gestiegene Motilität von Zellen ohne LMX1B erklären zu können, wurde zunächst die Organisation des Aktin-Zytoskeletts untersucht. Sollte hier eine fehlerhafte Anordnung oder Regulation des Grundgerüsts beobachtet werden, könnte dies die Ursache für eine erhöhte Beweglichkeit der Zellen sein. Zum Beispiel konnte in einem Modell der Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (PAN) bei Ratten eine verminderte Phosphorylierung von Tyrosinresten von Nephrin

gezeigt werden, welche wiederum zu einer Abnahme von F-Aktin in Glomeruli führte [Zhu et al., 2008; Uchida et al., 2008]. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass VEGFR2-Nephrin Komplexe die Signalübertragung zum Aktin-Zytoskelett vermitteln und dadurch Zellform und -funktion beeinflussen [Bertuccio et al., 2011]. Da der Aktin-Organisation somit eine wichtige Rolle zugeschrieben wird, sollte dies näher in unseren Modellen untersucht werden. Hierfür wurden Färbungen des Aktin-Zytoskeletts mittels FITC-Phalloidin in LMX1B-produzierenden HeLa- und LLC-PK₁-Zellen durchgeführt und mit nicht LMX1B-produzierenden Zellen verglichen. Es konnte allerdings kein Unterschied in der Aktin-Färbung der jeweiligen Vergleichsansätze und somit kein Unterschied in der Zytoskelett-Organisation beobachtet werden (s.a. 3.2.4). Eine spezielle Analyse von globulärem bzw. fibrillärem Aktin aus Proteinlysaten dieser Zellen brachte ebenso keine unterschiedlichen Mengen vom jeweiligen Protein zu Tage (s.a. 3.2.5). Eine Beeinträchtigung der Aktin-Organisation durch LMX1B wird somit nicht angenommen.

Unklar bleibt allerdings noch, ob weitere am Aufbau und Organisation des Grundgerüsts beteiligte Proteine betroffen sind. So konnte bereits gezeigt werden, dass Arhgap24 (RhoA-activated Rac1 GTPase-activating protein) für eine ausgewogene Balance von Rac1 und RhoA verantwortlich ist und ein Ausfall hiervon zu einer Bildung einer fokalen segmentalen Glomerulosklerose führen kann [Akilesh et al., 2011]. Ebenso könnten Unterschiede in der Organisation von Aktin-assoziierten Proteinen zu einem Verlust der Filtrationsbarriere führen. Fuchshofer et al. konnten CTGF (connective tissue growth factor) als einen Faktor bei der Reorganisation des Zytoskeletts, verursacht durch eine chronische Nierenschädigung durch PAN, ausmachen. Neueste Ergebnisse von Tillmann Burghardt zeigten in DNA-Mikroarray-Analysen und quantitativer Echtzeit-PCR eine Heraufregulation von *Abra* (actin-binding Rho activating protein; syn. STARS) und *Arl4c* (syn. Arl7) in Nieren von induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen (noch nicht veröffentlichte Daten). CHIP-Analysen von LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen bestätigten eine direkte Bindung von LMX1B sowohl an den Promotor des *ABRA* als auch an den des *ARL4C* Gens. ABRA ist ein Aktin-bindendes Protein, welches die Formierung des F-Aktins stimulieren und die Stabilisierung der Aktin-Filamente bewirken kann [Arai et al., 2002]. Für Arl4c konnte eine Rekrutierung von Cytohesin-2 zur Plasmamembran gezeigt werden, welches nun mit Paxilin interagieren kann, einem Protein verantwortlich für fokale Kontakte [Hofmann et al., 2007; Torii et al., 2010]. Obwohl in dieser Arbeit keine Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts durch *Lmx1b*/LMX1B gezeigt werden konnte, kann aufgrund neuerer Ergebnisse eine mögliche Rolle von *Lmx1b*/LMX1B bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts nicht ausgeschlossen werden.

4.3.3 Keine Beeinträchtigung der Ladungskomposition der GBM erkennbar

Eine erhöhte Durchlässigkeit für Proteine, wie sie im Falle der induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäuse zu beobachten war, kann auch durch eine Beeinträchtigung der Ladungskomposition der GBM hervorgerufen werden. Ramjee et al. konnten 1997 einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von anionischen Seitenketten und dem Auftreten einer Proteinurie beim Minimal-Change nephrotischen Syndrom nachweisen. Ein ähnliches Ergebnis konnte man nach Injektion eines gegen die glomeruläre Basalmembran gerichteten Antiserums in Hunden beobachten, bei welchen eine signifikant geringere Anzahl an anionischen Seiten bei Auftreten einer Proteinurie nachzuweisen war [Sugimoto et al., 1994].

Um die Bedeutung eines möglichen Verlusts von anionischen Ladungen auch in unserem Fall zu klären, wurden induzierbare Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Mäuse (und Kontrollmäuse) für eine Woche induziert, um die Bildung einer Proteinurie hervorzurufen, und anschließend die Nieren mittels Polyethylenimin behandelt, um anionische Ladungen zu markieren. Zur Analyse wurden die Markierungen der anionischen Ladungen innerhalb der GBM der beiden Versuchsgruppen ausgezählt und miteinander verglichen (s.a. 3.1.6). Hierbei ließ sich keine Beeinträchtigung der Verteilung und Häufigkeit der anionischen Ladungen in Knockout Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen feststellen; somit kann ein Verlust von anionischen Seitenketten und eine daraus resultierende Proteinurie ausgeschlossen werden.

4.3.4 *Lmx1b*/LMX1B ist an der Vermittlung des Kontakts von Zellen zu ihrer Oberfläche beteiligt

Da das Auftreten der Proteinurie in für eine Woche induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen wohl nicht auf eine Fehlorganisation des Zytoskeletts bzw. Fehlregulation des Membranpotentials zurückzuführen ist, sollte nun eine Beeinträchtigung der Kontaktvermittlung von Podozyten zu ihrer Oberfläche genauer untersucht werden. Wie bereits unter 4.3.1 beschrieben, wurde eine signifikant höhere Anzahl an ausgewachsenen Podozyten aus Glomeruli von induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen festgestellt als in Kontrollmäusen. Dies gab Anlass zur näheren Untersuchung von Kontakt-vermittelnden Proteinen. Der Kontakt von Podozyten zur darunter liegenden glomerulären Basalmembran wird über die Integrine $\alpha 3$ und $\beta 1$ vermittelt, welche wiederum mit dem Aktinzytoskelett verankert sind. Sollte eine Stö-

rung der Kontaktvermittlung vorliegen, würden die Podozyten ihre Verbindung zur GBM verlieren und ein Auftreten einer Proteinurie wäre erklärbar. Auch die gestiegene Motilität von HeLa-Zellen ohne LMX1B-Expression könnte in einer gestörten Vermittlung des Kontakts zu ihrer Oberfläche begründet sein.

Um eine eventuelle Regulation von Integrinen durch LMX1B untersuchen zu können, wurden trypsinisierte HeLa-Zellen (mit und ohne LMX1B) mit verschiedenen Konzentrationen an zyklischem RGD ausgesät. Zyklisches RGD dient als Ligand von Integrinen und stört dadurch die Bindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix. Eine 60minütige Aufnahme der ausgesäten HeLa-Zellen bezüglich deren Anheftung und Ausbildung von Ausläufern brachte zu Tage, dass Zellen ohne LMX1B unter dem Einfluss von zyklischem RGD wesentlich schlechter adhäreren konnten als mit LMX1B (s.a. 3.2.7). Dies war ein erster Hinweis auf eine Regulation der Integrin-vermittelten Kontaktaufnahme durch LMX1B; LMX1B scheint die Bindung über Integrine zu fördern. Diese Annahme konnte durch Western Blot Analysen von Proteinlysaten dieser Zellen bestätigt werden. Bei Verwendung eines gegen Integrin $\alpha 3$ gerichteten Antikörpers konnte eine Abnahme von Integrin $\alpha 3$ um ca. 50% in Zellen ohne LMX1B festgestellt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen des zyklischen RGD Versuchs überein: ohne LMX1B ist eine Beeinträchtigung der Integrin-vermittelten Kontaktaufnahme festzustellen. Ebenso wurden weitere Kontakt-vermittelnde Proteine, ILK bzw. FAK, im Western Blot getestet, welche allerdings nicht beeinflusst zu sein scheinen und äquivalente Spiegel in beiden Versuchsgruppen aufwiesen. Daten eines DNA-Mikroarrays von Nieren, Augen, Gliedmaßen und Leber von konventionellen *Lmx1b*-Knockout Mäusen zeigten eine auffällige Herabregulierung von *Ceacam1*, welches für eine Förderung der Adhäsion von Leukozyten an das Kapillarendothel bekannt ist [Starzyk et al., 2000]. Eine Herabregulierung von *Ceacam1* in *Lmx1b*-Knockout Mäusen könnte ebenfalls einen Verlust des Kontaktes von Podozyten zur GBM begründen. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung wurden allerdings nicht durchgeführt.

Eine gestörte Kontakt-Vermittlung über Integrine in Zellen ohne LMX1B/*Lmx1b* könnte die beobachtete erhöhte Motilität von HeLa- bzw. LLC-PK₁-Zellen und einen Verlust der Podozyten erklären. In der Niere spielt $\alpha 3$ -Integrin, zusammen mit dem Integrin $\beta 1$, eine bedeutende Rolle bei der Organogenese und stellt die Verankerung der Podozyten an die glomeruläre Basalmembran her [Kreidberg et al., 1996]. Konventionelle *Itga3*-Knockout Mäuse sterben bereits 24 h nach der Geburt und weisen Podozyten ohne Fußfortsätze und eine fragmentierte und unorganisierte glomeruläre Basalmembran auf [Kreidberg et al., 1996]. Strukturelle Auswertungen von 6

Wochen alten Podozyten-spezifischen *Itga3*-Knockout Mäusen zeigen einen kompletten Verlust der Fußfortsätze von Podozyten, sklerotisierte Glomeruli, Proteinansammlungen in erweiterten Tubuli und eine fehlerhaft organisierte GBM [Sachs et al., 2006]. Eine fehlerhafte Regulation von $\alpha 3$ -Integrin durch *Lmx1b* kann als Ursache für den Verlust der Podozyten angesehen werden.

4.4 Immunologische Relevanz von *Lmx1b*

Expressionsstudien mittels DNA-Mikroarray-Analysen und quantitativen Echtzeit-PCR Läufen offenbarten eine Regulation von Interferonen, Interleukinen und Interferon-stimulierbaren Genen durch LMX1B [Neumann, 2008]. CHIP-Analysen zeigten eine direkte Bindung von LMX1B an die Promotoren der *IL6* und *IL8* Gene in LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen [Rasche et al., 2009; Raschta, 2009]. Michel Le Hir konnte in Vorversuchen an *Lmx1b*-defizienten Mäusen eine mögliche Beeinträchtigung der Immunantwort feststellen (nicht veröffentlichte Daten). Da aus diesen Vorversuchen noch keine stichhaltigen Beweise für eine Beteiligung von *Lmx1b* an der Immunregulation in Mäusen erhalten wurden, sollte nun anhand verschiedener Assays eine mögliche Rolle von *Lmx1b* aufgedeckt werden.

4.4.1 *Lmx1b* ist an der Regulation der Immunantwort beteiligt

Sowohl Milz als auch Thymus sind wichtige Organe des Immunsystems und spielen eine bedeutende Rolle bei der Vermehrung, Differenzierung und Reifung von Immunzellen. Sie dienen somit als erste Anhaltspunkte zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von *Lmx1b* auf die Immunregulation oder immunrelevante Gene. Konventionellen neugeborenen *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen und adulten *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen wurden Milz und Thymus entfernt, um hieraus RNA zu präparieren und ein Expressionsprofil verschiedener Interferone zu erstellen. Interferone sind Proteine, die von Immunzellen sezerniert werden und dadurch Einfluss auf die Regelung der Immunantwort nehmen. Während man bei neugeborenen Mäusen keine signifikanten Unterschiede der Expression von Interferonen zwischen beiden Versuchsgruppen messen konnte, war bei adulten Mäusen die Expression von *Ifna*, *Ifnb* und *Ifng* im Thymus und *Ifng* in der Milz von heterozygoten Tieren deutlich herabreguliert (s.a. 3.4.1). Dies weist auf einen Einfluss von *Lmx1b* in der Kontrolle der Expression dieser Interferone hin. Untersuchte man

allerdings die jeweiligen Organe auf *Lmx1b*-Expression, konnte man im Falle der Milz gar keine Expression und im Thymus kaum eine Expression von *Lmx1b* messen. Möglich wäre natürlich eine *Lmx1b*-Expression von in diesen Organen einwandernden Zellen, aber auch eine Analyse dendritischer Zellen oder Makrophagen zeigte keine nennenswerte Expression von *Lmx1b* in diesen Zellpopulationen (s.a. 3.4.2 und 3.4.3).

Ergänzend zu diesem Versuchsansatz wurde von neugeborenen *Lmx1b*^(+/+)-, *Lmx1b*^(+/-)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen die Milz entfernt und Milzzellen in Kultur überführt. Diese Zellen wurden mit IL-3 stimuliert, um eine Aktivierung der basophilen Granulozyten zu bewirken, welche nun IL-6 in das Kulturmedium sezernierten. Diese Überstände wurden abgenommen und mittels ELISA die IL-6 Konzentrationen bestimmt; als Referenzwert dienten unstimulierte Milzzellen. Hierbei konnte man eine Abnahme der Aktivierung bei Knockout Mäusen feststellen. Betrug die Aktivierung in Wildtyp Mäusen noch das 45fache vom unstimulierten Wert, war die Aktivierung in heterozygoten Mäusen nur noch 24fach und in homozygoten Knockout Mäusen schließlich nur noch 9fach erhöht. Diese verminderte Aktivierung von basophilen Granulozyten ist somit auf einen Verlust von *Lmx1b* zurückzuführen und spiegelt dadurch die Wichtigkeit von *Lmx1b* bei der Regulation von Immunzellen wider.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann man eine Beeinträchtigung der Immunantwort annehmen, sind doch wichtige immunregulierende Faktoren durch einen Verlust von *Lmx1b* negativ betroffen. Man müsste annehmen, dass heterozygote oder homozygote *Lmx1b*-Knockout Mäuse eine geringere Immunantwort zeigen und dadurch leichter an Infektionen erkranken müssten. Doch homozygote Knockout Mäuse sterben innerhalb von 24 h nach der Geburt und dienen somit nicht für weitere Forschungen und heterozygote Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Eine Möglichkeit wäre, verschiedene Infektionsmodelle an *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen zu testen, um einen eventuellen Unterschied in deren Immunantwort zu verdeutlichen. Doch führten weder Tests bezüglich der T-Zell-Antwort (mit DSS oder Oxazolone) oder des Komplementsystems (mit CH₅₀-Assay) zu einem unterschiedlichen Ergebnis der Immunantwort von Wildtyp Mäusen und heterozygoten *Lmx1b*-Knockout Mäusen [Kastner, 2004]. Eine Infektion von LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen mit einem Salmonellen-Stamm zeigte ebenso keine unterschiedliche Immunreaktion im Vergleich zu nicht LMX1B-produzierenden Zellen (nicht veröffentlichte Daten).

So sollte ein weiteres Schädigungsmodell getestet werden, um eine Beeinträchtigung der Immunantwort in heterozygoten *Lmx1b*-Knockout Mäusen aufzudecken. Hierfür wurde *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen ein gegen die glomeruläre Basalmembran gerichtetes Serum intravenös injiziert, um eine Nierenschädigung mit folgender Proteinurie zu verursachen. Durch Injektion des Serums wandert entzündliches Infiltrat in renales Gewebe ein und induziert dadurch eine T-Zell abhängige Glomerulonephritis. Während bei Wildtyp Mäusen nie die Bildung einer Proteinurie zu beobachten war, konnte dies bei heterozygoten Mäusen in teilweise hohem Ausmaß beobachtet werden. Allerdings waren hier Tiere sowohl mit der Bildung einer sehr starken Proteinurie als auch mit überhaupt keiner Bildung einer Proteinurie vertreten. Diese großen Unterschiede der einzelnen Mäuse könnten zum einen aus der Schwierigkeit der intravenösen Injektion resultieren, weshalb man nicht immer von einer gleichbleibenden Aufnahme des Serums ausgehen kann. Auch kann eine äquivalente Verabreichung der vorangehenden Immunisierung mit Kaninchen-IgG nicht zu 100% angenommen werden, da durch Bewegungen der Mäuse das Depot verrutschte oder gar tröpfchenweise wieder aus der Einstichstelle austrat.

Zieht man die Schwierigkeiten der Verabreichung nicht in Betracht, könnte durch das Fehlen eines Allels von *Lmx1b* somit eine stärkere Immunantwort der T-Zellen hervorgerufen werden, wodurch die Mäuse in dieser Gruppe gehäuft erkranken. Aber auch eine unterschiedliche Komposition der GBM könnte ausschlaggebend für die stärkere Antwort in *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen sein, da hier eventuell die GBM so weit verändert vorliegt, dass eine vermehrte Anzahl von Immunkomplexen abgelegt werden kann [Ito et al., 1983; Jansky, 2007]. Da man zwar ein beeindruckendes Ergebnis erhält, dieses aber aufgrund einer geringen Anzahl an Versuchsmäusen pro Gruppe (13 bzw. 14) nicht signifikant ist, müsste man dieses Experiment mit einer erhöhten Anzahl an Mäusen durchführen. Sollte sich hieraus das Ergebnis bestätigen, könnte man von einem phänotypischen Unterschied von *Lmx1b*^(+/-)- Mäusen zu *Lmx1b*^(+/+)-Mäusen sprechen. Neben den Beobachtungen eines verminderten kompensatorischen Wachstums der verbleibenden Niere nach einer Uninephrektomie in Mäusen [Endele et al., 2007] wäre dies erst der zweite Fall eines Nachweises für einen Phänotyp von heterozygoten Mäusen.

4.4.2 Durch Stimulation von MEFs über Toll-like Rezeptoren wird die Expression von *Lmx1b* herabgesetzt

Da homozygote *Lmx1b*-Knockout Mäuse bereits 24 h nach ihrer Geburt sterben, stehen diese leider nicht für weitreichendere Versuchsansätze und Analysen zur Verfügung. Eine Möglichkeit, diesen Nachteil zu umgehen, ist die Verwendung von MEFs (mouse embryonic fibroblasts), die aus Gliedmaßen von Embryos gewonnen werden, welche am Embryonaltag 14,5 aus dem Uterus entfernt worden waren. Nun können MEFs von *Lmx1b*^(+/+)-, *Lmx1b*^(+/-)- und *Lmx1b*^(-/-)-Mäusen als primäre Zellkultur genutzt und für verschiedene Assays angewendet werden.

Ergebnisse aus einem DNA-Mikroarray und aus quantitativen Echtzeit-PCR Läufen zeigten eine Regulation von Interferonen und Interferon-induzierbaren Genen in LMX1B-induzierbaren HeLa-Zellen [Neumann, 2008]. Die Erwartung war, dass auch in MEFs der einzelnen Versuchsgruppen nach Behandlung mit verschiedenen Agentien eine veränderte Immunantwort mit unterschiedlich regulierter Genexpression aufgedeckt werden könnte. Analysen der Expressionsprofile von stimulierten und unstimulierten MEFs von homozygoten und heterozygoten *Lmx1b*-Knockout Mäusen wiesen divergente Ergebnisse auf. So konnte bei Verwendung von LPS als Stimulans kein Unterschied bei *Il6* oder *Il1b* in den Versuchsgruppen gefunden werden, während bei *Irf2* eine schwächere Abnahme und bei *Irf3* eine stärkere Abnahme der Expression in Knockout Mäusen nach Stimulation festzustellen war. Nach Stimulation mit Interferon- γ konnte wiederum keine Abnahme der Expression von *Irf2*, aber eine schwächere Expression bei *Isg15*, *Irf1* und *Il6* und eine stärkere Expression von *Stat1* in Knockout Mäusen beobachtet werden. Bei Verwendung von Peptidoglykan konnte eine schwächere Expression von *Il6* und *Il1b* nach Stimulation in Knockout Mäusen gemessen werden und bei Poly I:C sogar eine stärkere Zunahme der Expression von *Il6* in Knockout Mäusen. Diese Ergebnisse ließen aufgrund ihrer unterschiedlichen Ausprägung keine Rückschlüsse auf irgendeine bestimmte Regulation durch *Lmx1b* zu. Allerdings ergab die gleichzeitige Messung der Expression von *Lmx1b* in den einzelnen Ansätzen eine übereinstimmende Herabregulation von *Lmx1b* nach Stimulation mit allen Reagenzien. Egal ob MEFs mit LPS, IFN- γ , Peptidoglykan oder Poly I:C stimuliert worden waren, war immer eine Abnahme der *Lmx1b*-Expression in *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen zu beobachten. Dies war ein überraschendes Ergebnis, war doch nicht eine Regulation von *Lmx1b* durch Interferone oder Interferon-stimulierbare Gene erwartet worden. Da alle zuvor genannten Reagenzien über Toll-like Rezeptoren wirken, kann man annehmen, dass ein zentraler Faktor in dieser Signalkette eine entscheidende Bedeutung in der Regulation von *Lmx1b* haben könnte. Betrachtet

man die Signalkaskade genauer, fällt vor allem der Transkriptionsfaktor NF- κ B auf, von dem bekannt ist, dass er zahlreiche Zellvorgänge wie Immunantwort, Zellproliferation oder Apoptose steuert [Oeckinghaus et al., 2011]. Über eine Regulation von Lmx1b durch andere Faktoren, sei es indirekt oder direkt, ist allerdings bisher nichts bekannt und wurde auch in dieser Arbeit nicht näher erforscht.

5. Zusammenfassung

Eine Beteiligung von LMX1B an Entwicklungsvorgängen ist unumstritten, gibt es doch zahlreiche fehlentwickelte Strukturen, die auf einen LMX1B-Defekt zurückzuführen sind. Wie diese Vorgänge allerdings ablaufen, ist noch weitgehend unerforscht. Ein geeignetes Mittel hierfür war die Entwicklung der konventionellen *Lmx1b*-Knockout Maus, anhand derer man zahlreiche strukturelle und molekulare Veränderungen bei einem *Lmx1b*-Defekt untersuchen konnte. Übereinstimmend bei Patienten und Knockout Mäusen konnten so Veränderungen der Augen, Gliedmaßen und der Nierenstruktur nachgewiesen werden. Durch die Entwicklung der Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Maus war eine nähere Untersuchung der Nierenveränderungen möglich, wodurch allerdings auch eine primäre Entwicklung der Podozyten festgestellt werden konnte, während die Podozyten sekundär wieder verloren gingen. Das warf die Frage auf, ob *Lmx1b* auch für die Aufrechterhaltung der podozytären Struktur verantwortlich ist. Hierfür wurde eine induzierbare Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Maus entwickelt, bei der *Lmx1b* zum gewünschten Zeitpunkt speziell in den Podozyten ausgeschaltet werden konnte.

Diese induzierbare Podozyten-spezifische *Lmx1b*-Knockout Maus entwickelte bereits nach einwöchiger Induktion mit Doxyzyklin eine heftige Proteinurie, welche über einen längeren Zeitraum nur noch leicht zunahm. Untersuchte man allerdings diese einwöchig induzierten Mäuse, konnte man keine gravierenden Schädigungen der Nierenstruktur feststellen. Immunhistologische Analysen für Strukturproteine der GBM bzw. Podozyten wiesen eine normale Färbung auf, und sogar in elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Nieren konnten nur geringe Veränderungen wie gelegentliche Verluste von Podozyten festgestellt werden. Da zu diesem Zeitpunkt die Proteinurie allerdings schon relativ hoch war, mussten andere Gründe ursächlich für den Verlust der Filtrationsbarriere sein, konnte doch nachgewiesen werden, dass Podozyten Apoptose begehen und somit verloren gehen. Zusätzlich zu diesen Beobachtungen zeigten Versuche mit HeLa-Zellen (Scratch-Assay bzw. Beweglichkeitsstudien), dass diese eine erhöhte Motilität aufwiesen, wenn kein LMX1B produziert wurde. Übereinstimmend hierzu war ein vermehrtes Auswachsen von Podozyten aus präparierten Glomeruli von induzierten Podozyten-spezifischen *Lmx1b*-Knockout Mäusen festzustellen. So lässt sich zusammenfassen: Ist *Lmx1b*/LMX1B vorhanden, sind die Zellen unbeweglicher, fehlt *Lmx1b*/LMX1B, können sie sich freier bewegen.

Eine erhöhte Motilität von Zellen kann zwei Ursachen haben: Zum einen kann das Zytoskelett betroffen sein, indem es eine veränderte Organisation aufweist und somit die Zellen bei Wanderungen beweglicher sind, oder zum anderen kann die Kontaktvermittlung beeinträchtigt sein, wodurch Zellen nicht so stark an ihrer Oberfläche haften und somit wiederum eine erhöhte Motilität zeigen. Der Vergleich des Aufbaus des Zytoskeletts von HeLa-Zellen mit und ohne LMX1B zeigte keine Unterschiede in der Organisation. Auch Analysen von Strukturproteinen oder des Membranpotentials wiesen keine Beeinträchtigungen auf.

Bei der Untersuchung der Kontaktvermittlung von Podozyten wurden insbesondere die Integrine untersucht, da Podozyten mit der darunterliegenden GBM über die Integrine $\alpha 3$ und $\beta 1$ verankert sind. In der Tat konnte ein geringerer Spiegel an $\alpha 3$ -Integrin in HeLa-Zellen ohne LMX1B im Western Blot nachgewiesen werden und auch eine Beeinträchtigung der Anheftung der Zellen durch Verwendung von zyklischem RGD, einem kompetitiven Liganden für Integrine, zeigte in HeLa-Zellen ohne LMX1B eine stärkere Auswirkung. Weitere Kontakt-vermittelnde Proteine, wie FAK oder ILK, scheinen hingegen nicht betroffen zu sein. Aus vorliegenden Ergebnissen ist daher zu schließen, dass *Lmx1b*/LMX1B die Kontaktvermittlung über Integrine moduliert und bei einem Ausfall in Mäusen ein Verlust der Adhäsion von Podozyten zur GBM folgt, woraufhin die Podozyten verloren gehen und die Bildung einer Proteinurie verursacht wird.

Zusätzlich zu diesem Hauptthema dieser Doktorarbeit wurden auch immunologische Tests an Mäusen durchgeführt, da Vorversuche eine mögliche Beeinträchtigung der Immunantwort in *Lmx1b*^(+/-)-Knockout Mäusen ergaben. Während eine Herabregulierung von Interferonen in Milz und Thymus und eine schwächere Aktivierung von basophilen Granulozyten in der Milz festgestellt werden konnte, zeigte eine Genexpressionsanalyse dieser Organe, dass hier kein *Lmx1b* exprimiert wird. Auch eine Analyse von Makrophagen oder dendritischen Zellen deckte keine *Lmx1b*-Expression dieser einwandernden Zellen auf. Allerdings zeigte ein Schädigungsmodell durch Injektion eines anti-GBM-Serums eine unterschiedliche Reaktion von *Lmx1b*^(+/+)- und *Lmx1b*^(+/-)-Mäusen. Während alle Wildtyp Mäuse gesund blieben, bildeten einige heterozygote Mäuse eine heftige Proteinurie. Aufgrund des sehr heterogenen Erscheinungsbildes müssen diese Versuche allerdings mit höherer Fallzahl wiederholt werden. Dies wäre ein Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Immunregulation durch *Lmx1b*.

6. Literaturverzeichnis

Akilesh S., Suleiman H., Yu H., Stander M.C., Lavin P., Gbadegesin R., Antignac C., Pollak M., Koop J.B., Winn M.P., Shaw A.S. (2011). Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest* **121**: 4127-4137

Al-Aouni C., Herbach N., Blattner S.M., Henger A., Rastaldi M.P., Jarad G., Miner J.H., Moeller M.J., St-Arnaud R., Dedhar S., Holzman L.B., Wanke R., Kretzler M. (2006). Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* **17**: 1334-1344

Arai A., Spencer J.A., Olson E.N. (2002). STARS, a striated muscle activator of Rho signaling and serum response factor-dependent transcription. *J Biol Chem* **277**: 24453-24459

Asanuma K., Kim K., Oh J., Giardino L., Chabanis S., Faul C., Reiser J., Mundel P. (2005). Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* **115**: 1188-1198

Assinder S.J., Stanton J.A., Prasad P.D. (2009). Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 482-486

Bach I., Rodriguez-Esteban C., Carriere C., Bhushan A., Krones A., Rose D.W., Glass C.K., Andersen B., Belmonte J.C.I., Rosenfeld M.G. (1999). RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nat Genet* **22**: 394-399

Ballermann B.J. (2007). Contribution of the endothelium to the glomerular permselectivity barrier in health and disease. *Nephron Physiol* **106**: 19-25

Ballermann B.J. (2005). Glomerular endothelial cell differentiation. *Kidney Int* **67**: 1668-1671

Banerjee-Basu S., Baxevas A. (2001). Molecular evolution of the homeodomain family transcription factors. *Nucleic Acids Res* **29**: 3258-3269

- Barbaux S., Niaudet P., Gubler M.C., Grunfeld J.P., Jaubert F., Kuttann F., Fekete C.N., Souleyreau-Therville N., Thibaud E., Fellous M., McElreavey K. (1997).** Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* **17**: 467-470
- Barletta G.M., Kovari I.A., Verma R.K., Kerjaschki D., Holzman L.B. (2003).** Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem* **278**: 19266-19271
- Ben-Bassat M., Cohen L., Rosenfeld J. (1971).** The glomerular basement membrane in the nail-patella syndrome. *Arch Pathol* **92**: 350-355
- Bertuccio C., Veron D., Aggarwal P., Holzman L., Tufro A. (2011).** Vascular endothelial growth factor receptor 2 direct interaction with nephrin links VEGF-A signals to actin in kidney podocytes. *J Biol Chem* **286**: 39933-39944
- Blank V., Andrews N.C. (1997).** The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci* **22**: 437-441
- Blutke, A.F. (2008).** Common patterns of glomerular gene expression profiles in different murine models of early nephropathy. *Dissertation, LMU München, Tierärztliche Fakultät*
- Bongers E.M.H.F., Gubler M.-C., Knoers N.V.A.M. (2002).** Nail-patella syndrome. Overview on clinical and molecular findings. *Pediatr Nephrol* **17**: 703-712
- Boronat S., Campbell J.L. (2008).** Linking mitosis with S-phase: Cdc6 at play. *Cell cycle* **7**: 597-601
- Boute N., Gribouval O., Roselli S., Benessy F., Lee H., Fuchshuber A., Dahan K., Gubler M.-C., Niaudet P., Antignac C. (2000).** NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephritic syndrome. *Nat Genet* **24**: 349-354
- Brodsky S.V., Yamamoto T., Tada T., Kim B., Chen J., Kajiys F., Goligorsky M.S. (2002).** Endothelial dysfunction during ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**: F1140-F1149

- Bustin S.A. (2000).** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**: 169-193
- Caulfield J.P., Farquhar M.G. (1978).** Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* **39**: 505-512
- Chambers J.C., Zhang W., Lord G.M., van der Harst P., Lawlor D.A., Sehmi J.S., Gale D.P., Wass M.N., Ahmadi K.R., Bakker S.J., Beckmann J., Bilo H.J., Bochud M., Caulfield M.J., Connell J.M., et al. (2010).** Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet* **42**: 373-375
- Chen H., Lun Y., Ovchinnikov D., Kokubo H., Oberg K.C., Pepicelli C.V., Gan L., Lee B., Johnson R.L. (1998).** Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat Genet* **19**: 51-55
- Chen C.A., Hwang J.C., Guh J.Y., Chang J.M., Lai Y.H., Chen H.C. (2006).** Reduced podocyte expression of $\alpha 3\beta 1$ integrins and podocyte depletion in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis and chronic PAN-treated rats. *J Lab Clin Med* **147**: 74-82
- Chen S., He F.F., Wang H., Fang Z., Shao N., Tian X.J., Liu J.S., Zhu Z.H., Wang Y.M., Huang K., Zhang C. (2011).** Calcium entry via TRPC6 mediates albumin overload-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in podocytes. *Cell Calcium* **Epub ahead of print**
- Choi H.J., Lee B.H., Kang J.H., Jeong H.J., Moon K.C., Ha I.S., Yu Y.S., Matejas V., Zenker M., Choi Y., Cheong H.I. (2008).** Variable phenotype of Pierson syndrome. *Pediatr Nephrol* **23**: 995-1000
- Chuang P.Y., Dai Y., Liu R., He H., Kretzler M., Jim B., Cohen C.D., He J.C. (2011).** Alteration of forkhead box O (Foxo4) acetylation mediates apoptosis of podocytes in diabetes mellitus. *PLoS One* **6**: e23566-23575
- Chuang P.Y., He J.C. (2009).** Signaling in regulation of podocyte phenotypes. *Nephron Physiol* **111**: 9-15

Ciani L., Patel A., Allen N.D., French-Constant C. (2003). Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol* **23**: 3575-3582

Clough M.V., Hamlington J.D., McIntosh I. (1999). Restricted distribution of loss-of-function mutations within the LMX1B genes of nail-patella syndrome patients. *Hum Mutat* **14**: 459-465

Cottone S., Mule G., Amato F., Riccobene R., Vadala A., Lorito M.C., Raspanti F., Cerasola G. (2002). Amplified biochemical activation of endothelial function in hypertension associated with moderate to severe renal failure. *J Nephrol* **15**: 643-648

Cui S., Li C., Ema M., Weinstein J., Quaggin S.E. (2005). Rapid isolation of glomeruli coupled with gene expression profiling identifies downstream targets in Pod1 knockout mice. *J Am Soc Nephrol* **16**: 3247-3255

Curtiss J., Heilig J.S. (1998). DeLIMiting development. *BioEssays* **20**: 58-69

Dawid I.B., Toyama R., Taira M. (1995). LIM domain proteins. *C R Acad Sci III* **318**: 295-306

Deen W.M. (2004). What determines glomerular capillary permeability? *J Clin Invest* **114**: 1412-1414

Del Pozo E., Lapp H. (1970). Ultrastructure of the kidney in the nephropathy of the nail-patella syndrome. *Am J Clin Pathol* **54**: 845-851

Ding Y.-Q., Marklund U., Yuan W., Yin J., Wegman L., Ericson J., Deneris E., Johnson R.L., Chen Z.-F. (2003). Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons. *Nature Neurosci* **6**: 933-938

Disenza M.T., Pelletier J. (2004). Insights into the physiological role of WT1 from studies of genetically modified mice. *Physiol Genomics* **16**: 287-300

Donoviel D.B., Freed D.D., Vogel H., Potter D.G., Hawkins E., Barrish J.P., Mathur B.N., Turner C.A., Geske R., Montgomery C.A., Starbuck M., Brandt M., Gupta A., Ramirez-

- Solis R., Zambrowicz B.P., Powell D.R. (2001).** Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* **21**: 4829-4836
- Dressler G.R., Douglass E.C. (1992).** Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1179-1183
- Dreyer S.D., Morello R., German M.S., Zabel B., Winterpacht A., Lunstrum G.P., Horton W.A., Oberg K.C., Lee B. (2000).** LMX1B transactivation and expression in nail-patella syndrome. *Hum Mol Genet* **9**: 1067-1074
- Dreyer S.D., Zhou G., Baldini A., Winterpacht A., Zabel B., Cole W., Johnson R.L., Lee B. (1998).** Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet* **19**: 47-50
- Dunston J.A., Hamlington J.D., Zaveri J., Sweeney E., Sibbring J., Tran C., Malbroux M., O'Neill J.P., Mountford R., McIntosh I. (2004).** The human *LMX1B* gene: transcription unit, promoter, and pathogenic mutations. *Genomics* **84**: 565-576
- Dvir L., Srour G., Abu-Ras R., Miller B., Shaley S.A., Ben-Yosef T. (2010).** Autosomal-recessive early-onset retinitis pigmentosa caused by a mutation in PDE6G, the gene encoding the gamma subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Am J Hum Genet* **87**: 258-264
- Eichinger C.S., Mizuno T., Mizuno K., Miyake Y., Yanagi K., Imamoto N., Hanaoka F. (2009).** Aberrant DNA polymerase alpha is excluded from the nucleus by defective import and degradation in the nucleus. *J Biol Chem* **284**: 30604-30614
- Eremina V., Sood M., Haigh J., Nagy A., Lajoie G., Ferrara N., Gerber H.-P., Kikkawa Y., Miner J.H., Quaggin S.F. (2003).** Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* **111**: 707-716
- Eremina V., Jefferson J.A., Kowalewska J., Hochster H., Haas M., Weisstuch J., Richardson C., Kopp J.B., Kabir M.G., Backx P.H., Gerber H.P., Ferrara N., Barisoni L., Alpers C.E., Quaggin S.E. (2008).** VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* **358**: 1129-1136

- Evan G.L., Lewis G.K., Ramsay G., Bishop J.M. (1985).** Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**: 3610-3616
- Farley F.A., Lichter P.R., Downs C.A., McIntosh I., Vollrath D., Richards J.E. (1999).** An orthopaedic scoring system for nail-patella syndrome and application to a kindred with variable expressivity and glaucoma. *J Pediatr Orthop* **19**: 624-631
- Faul C., Asanuma K., Yanagida-Asanuma E., Kim K., Mundel P. (2007).** Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **17**: 428-437
- Fiedler S.E., Baipai M., Carr D.W. (2008).** Identification and characterization of RHOA-interacting proteins in bovine spermatozoa. *Biol Reprod* **78**: 184-192
- Freyd G., Kim S.K., Horvitz H.R. (1990).** Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* **344**: 876-879
- Fuchshofer R., Ullmann S., Zeilbeck L.F., Baumann M., Junglas B., Tamm E.R. (2011).** Connective tissue growth factor modulates podocyte actin cytoskeleton and extracellular matrix synthesis and is induced in podocytes upon injury. *Histochem Cell Biol* **136**: 301-319
- Furukawa T., Ohno S., Oguchi H., Hora K., Tokunaga S., Furuta S. (1991).** Morphometric study of glomerular slit diaphragms fixed by rapid-freezing and freeze-substitution. *Kidney Int* **40**: 621-624
- Gehring W.J., Affolter M., Burglin T. (1994).** Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* **63**: 487-526
- Gerke P., Sellin L., Kretz O., Petraschka D., Zentgraf H., Benzing T., Walz G. (2005).** NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol* **16**: 1693-1702

- German M.S., Wang J., Chadwick R.B., Rutter W.J. (1992).** Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeodomain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev* **6**: 2165-2176
- Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M. (1996).** A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* **6**: 995-1001
- Giunti S., Barutta F., Perin P.C., Gruden G. (2010).** Targeting the MCP-1/CCR2 system in diabetic kidney disease. *Curr Vasc Pharmacol* **8**: 849-860
- Gossen M., Bujard H. (1992).** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5547-5551
- Groffen A.J., Ruegg M.A., Dijkman H., van de Velden T.J., Buskens C.A., van den Born J., Assmann K.J., Monnens L.A., Veerkamp J.H., van den Heuvel L.P. (1998).** Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. *J Histochem Cytochem* **46**: 19-27
- Gunwar S., Ballester F., Noelken M.E., Sado Y., Ninomiya Y., Hudson B.G. (1998).** Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of alport syndrome. *J Biol Chem* **15**: 8767-8775
- Guo J.K., Menke A.L., Gubler M.C., Clarke A.R., Harrison D., Hammes A., Hastie N.D., Schedl A. (2002).** WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic Glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet* **11**: 651-659
- Haas M. (2009).** Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy. *Arch Pathol Lab Med* **133**: 224-232
- Hamlington J.D., Jones C., McIntosh I (2001).** Twenty-two novel LMX1B mutations identified in nail patella syndrome (NPS) patients. *Hum Mutat* **18**: 458-460

- Hamlington J.D., Clough M.V., Dunston J.A., McIntosh I. (2000).** Deletion of a branchpoint consensus sequence in the LMX1B gene causes exon skipping in a family with nail patella syndrome. *Eur J Hum Genet* **8**: 311-314
- Harvey S.J., Jarad G., Cunningham J., Rops A.L., van der Vlag J., Berden J.H., Moeller M.J., Holzman L.B., Burgess R.W., Mine J.H. (2007).** Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity. *Am J Pathol* **171**: 139-152
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996).** Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986-994
- Heidet L., Bongers E.M.H.F., Sich M., Zhang S.-Y., Loirat C., Meyrier A., Broyer M., Landthaler G., Faller B., Sado Y., Knoers N.V.A.M., Gubler M.-C. (2003).** In vivo expression of putative LMX1B targets in nail-patella syndrome kidneys. *Am J Pathol* **163**: 145-155
- Henry C.B.S., Duling B.R. (1999).** Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **277**: H508-H514
- Hobert O., Westphal H. (2000).** Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet* **16**: 75-83
- Hu Y., Xing J., Chen L., Guo X., Du Y., Zhao C., Zhu Y., Lin M., Zhou Z., Sha J. (2008).** RGS22, a novel testis-specific regulator of G-protein signaling involved in human and mouse spermiogenesis along with GNA12/12 subunits. *Biol Reprod* **79**: 1021-1029
- Hofmann I., Thompson A., Sanderson C.M., Munro S. (2007).** The Arl4 family of small G proteins can recruit the cytohesin Arf6 exchange factors to the plasma membrane. *Curr Biol* **17**: 711-716
- Huber T.B., Kottgen M., Schilling B., Walz G., Benzing T. (2001).** Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem* **276**: 41543-41546
- Huber T.B., Kwoh C., Wu H., Asanuma K., Gödel M., Hartleben B., Blumer K.J., Miner J.H., Mundel P., Shaw A.S. (2006).** Bigenic mouse models of focal segmental glomerulosclerosis-

sis involving pairwise interaction of CD2AP, Fyn, and Synaptopodin. *J Clin Invest* **116**: 1337-1345

Huber T.B., Schmidts M., Gerke P., Schermer B., Zahn A., Hartleben B., Sellin L., Walz G., Benzing T. (2003). The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. *J Biol Chem* **278**: 13417-13421

Hudson B.G., Tryggvason K., Sundaramoorthy M., Neilson E.G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* **348**: 2543-2556

Hudson B.G., Reeders S.T., Tryggvason K. (1993). Type IV collagen: Structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* **268**: 26033-26036

Hull R.N., Cherry W.R., Weaver G.W. (1976). The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* **12**: 670-677

Imaki J., Onodera H., Tsuchiya K., Imaki T., Mochizuki T., Mishima T., Yamashita K., Yoshida K., Sakai M. (2000). Developmental expression of maf-1 messenger ribonucleic acid in rat kidney by in situ hybridization histochemistry. *Biochem Biophys Res Commun* **272**: 777-782

Inoue T., Yaoita E., Kurihara H., Shimizu F., Sakai T., Kobayashi T., Ohshiro K., Kawachi H., Okada H., Suzuki H., Kihara I., Yamamoto T. (2001). FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* **59**: 1003-1012

Ito M., Yamada H., Okamoto K., Suzuki Y. (1983). Crescentic type nephritis induced by anti-glomerular basement membrane (GBM) serum in rats. *Jpn J Pharmacol* **33**: 1145-1154

Iuchi Y., Okada F., Tsunoda S., Kibe N., Shirasawa N., Ikawa M., Okabe M., Ikeda Y., Fujii J. (2009). Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem J* **419**: 149-158

- Jansky G.L. (2007).** Die Rolle von Sirolimus in experimenteller anti-GBM Glomerulonephritis in C57BL/6 Mäusen. *Dissertation, Medizinische Universität Innsbruck*
- Jarad G., Pippin J.W., Shankland S.J., Kreidberg J.A., Miner J.H. (2011).** Dystroglycan does not contribute significantly to kidney development or function, in health or after injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **300**: F811-820
- Jarad G., Miner J.H. (2009).** Update on the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **18**: 226-232
- Jarad G., Cunningham J., Shaw A.S., Miner J.H. (2006).** Proteinuria precedes podocyte abnormalities in $\text{Lamb2}^{-/-}$ mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. *J Clin Invest* **116**: 2272-2279
- Jansson M., Haraldsson B. (2006).** Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol* **290**: F111-F116
- Jacobson S.H., Egberg N., Hylander B., Lundahl J. (2002).** Correlation between soluble markers of endothelial dysfunction in patients with renal failure. *Am J Nephrol* **22**: 42-47
- Jakobsson L., Domogatskaya A., Tryggvason K., Edgar D., Claesson-Welsh L. (2008).** Laminin deposition is dispensable for vasculogenesis but regulates blood vessel diameter independent of flow. *FASEB J* **22**: 1530-1539
- Johnson J.D., Zhang W., Rudnick A., Rutter W.J., German M.S. (1997).** Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins: the LIM2 domain determines specificity. *Mol Cell Biol* **17**: 3488-3496
- Juhanson P., Kepp K., Org E., Veldre G., Kelgo P., Rosenberg M., Viigimaa M., Laan M. (2008).** N-acetyltransferase 8, a positional candidate for blood pressure and renal regulation: resequencing, association and in silico study. *BMC Med Genet* **10**: 9-25

- Juhila J., Roozendaal R., Lassila M., Verbeek S.J., Holthofer H. (2006).** Podocyte cell-specific expression of doxycycline inducible Cre recombinase in mice. *J Am Soc Nephrol* **17**: 648-654
- Junqueira L.C.U., Carneiro J., Gratzl M. (2005).** Histologie, *Springer Medizin Verlag*, 6. Auflage, Heidelberg
- Jurata L.W., Gill G.N. (1997).** Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. *Mol Cell Biol* **17**: 5688-5698
- Kanasaki K., Kanda Y., Palmsten K., Tanjore H., Lee S.B., Lebleu V.S., Gattone V.H. Jr., Kalluri R. (2008).** Integrin beta1-mediated matrix assembly and signaling are critical for the normal development and function of the kidney glomerulus. *Dev Biol* **313**: 584-593
- Kaplan J.M., Kim S.H., North K.N., Rennke H., Correia L.A., Tong H.Q., Mathis B.J., Rodriguez-Perez J.C., Allen P.G., Beggs A.H., Pollak M.R. (2000).** Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* **24**: 251-256
- Karlsson O., Thor S., Norberg T., Ohsson H., Edlund T. (1990).** Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* **344**: 879-882
- Kastner J. (2004).** Charakterisierung des wachstumsinhibitorischen Effekts des LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktors 1 Beta (LMX1B). *Diplomarbeit Universität Regensburg*
- Kaufman L., Potla U., Coleman S., Dikiy S., Hata Y., Kurihara H., He J.C., D'Agati V.D., Klotman P.E. (2010).** Up-regulation of the hemophilic adhesion molecule sidekick-1 in podocytes contributes to glomerulosclerosis. *J Biol Chem* **285**: 25677-25685
- Kerjaschki D. (2001).** Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* **108**: 1583-1587

- Kerjaschki D., Sharkey D.J., Farquhar M.G. (1984).** Identification and characterization of podocalyxin – the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* **98**: 1591-1596
- Kestilä M., Lenkkeri U., Männikkö M., Lamerdin J., McCready P., Putaala H., Ruotsalainen V., Morita T., Nissinen M., Herva R., Kashtan C.E., Peltonen L., Holmberg C., Olsen A., Tryggvason K. (1998).** Positionally cloned gene for a novel glomerular protein- nephrin – is mutated in congenital nephritic syndrome. *Mol Cell* **1**: 575-582
- Kim J.M., Wu H., Green G., Winkler C.A., Kopp J.B., Miner J.H., Unanue E.R., Shaw A.S. (2003).** CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* **23**: 1298-1300
- Kimura J., Ichii O., Otsuka S., Kanazawa T., Namiki Y., Hashimoto Y., Kon Y. (2011).** Quantitative and qualitative urinary cellular patterns correlate with progression of murine glomerulonephritis. *PLoS One* **6**: e16472-16482
- Kitching A.R., Tipping P.G., Timoshanko J.R., Holdsworth S.R. (2000).** Endogenous interleukin-10 regulates Th1 responses that induce crescentic Glomerulonephritis. *Kidney Int* **57**: 518-525
- Knoers N.V.A.M., Bongers E.M.H.F., van Beersum S.E.C., Lommen E.J.P., Bokhoven H.V., Hol F.A. (2000).** Nail-patella syndrome: Identification of mutations in the *LMX1B* gene in dutch families. *J Am Soc Nephrol* **11**: 1762-1766
- Kobayashi A., Kwan K.-M., Carroll T.J., McMahon A.P., Mendelsohn C.L., Behringer R.R. (2005).** Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* **132**: 2809-2823
- Kobayashi N., Reiser J., Kriz W., Kuriyama R., Mundel P. (1998).** Nonuniform microtubular polarity established by CHO1/MKLP1 motor protein is necessary for process formation of podocytes. *J Cell Biol* **143**: 1961-1970

- Kos C.H., Le T.C., Sinha S., Henderson J.M., Kim S.H., Sugimoto H., Kalluri R., Gerszten R.E., Pollak M.R. (2003).** Mice deficient in α -actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest* **111**: 1683-1690
- Kreidberg J.A., Donovan M.J., Goldstein S.L., Rennke H., Shepherd K., Jones R.C., Jaenisch R. (1996).** Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* **122**: 3537-3547
- Kriz W., Kretzler M., Provoost A.P., Shirato I. (1996).** Stability and leakiness: opposing challenges to the Glomerulus. *Kidney Int* **49**: 1570-1574
- Kretzler M. (2002).** Regulation of adhesive interaction between podocytes and glomerular basement membrane. *Microsc Res Tech* **57**: 247-253
- Lehtonen S., Zhao F., Lehtonen E. (2002).** CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**: F734-743
- Li C.J., Elsasser T.H. (2005).** Butyrate-induced apoptosis and cell cycle arrest in bovine kidney epithelial cells: involvement of caspase and proteasome pathways. *J Anim Sci* **83**: 89-97
- Li Y., Zhao J., Chen S., Zeng X., Du Q., Yang Y., Lu F., Pu Y., Yang Z. (2008).** A novel mutation in *LMX1B* gene causes nail-patella syndrome in a large Chinese family. *Bone* **43**: 591-595
- Lichter P.R., Richards J.E., Downs C.A., Stringham H.M., Boehnke M., Farley F.A. (1997).** Cosegregation of open-angle glaucoma and the nail-patella syndrome. *Am J Ophthalmol* **124**: 506-515
- Liu G., Kaw B., Kurfis J., Rahmanuddin S., Kanwar Y.S., Chugh S.S. (2003).** Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* **112**: 209-221
- Liu A., Dardik A., Ballermann B.J. (1999).** Neutralizing TGF- β 1 antibody infusion in neonatal rat delays in vivo glomerular capillary formation. *Kidney Int* **56**: 1334-1348

- Löwik M.M., Groenen P.J., Pronk I., Lilien M.R., Goldschmeding R., Dijkman H.B., Levchenko E.N., Monnens L.A., van den Heuvel L.P. (2007).** Focal segmental glomerulosclerosis in a patient homozygous for a CD2AP mutation. *Kidney Int* **72**: 1198-1203
- Marini M., Giacomelli F., Seri M., Ravazzolo R. (2005).** Interaction of the LMX1B and PAX2 gene products suggests possible molecular basis of differential phenotypes in nail-patella syndrome. *Eur J Hum Genet* **13**: 789-792
- Matsuda F., Inoue N., Maeda A., Cheng Y., Sai T., Gonda H., Goto Y., Sakamaki K., Manabe N. (2011).** Expression and function of apoptosis initiator FOXO3 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev* **57**: 151-158
- Matsunaga E. (1981).** Genetics of Wilms' tumor. *Hum Genet* **57**: 231-246
- Matthews J.M., Visvander J.E. (2003).** LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional co-factor that interacts with diverse proteins. *EMBO Rep* **4**: 1132-1137
- McGinnis W., Levine M.S., Hafen E., Kuroiwa A., Gehring W.J., (1984).** A conserved DNA sequence in homeotic genes of the Drosophila Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* **308**: 428-433
- McIntosh I., Dreyer S.D., Clough M.V., Dunston J.A., Eyaid W., Roig C.M., Montgomery T., Ala-Mello S., Kaitila I., Winterpacht A., Zabel B., Frydman M., Cole W.G., Francomano C.A., Lee B. (1998).** Mutation analysis of *LMX1B* gene in nail-patella syndrome patients. *Am J Hum Genet* **63**: 1651-1658
- McIntosh I., Dunston J.A., Liu L., Hoover-Fong J.E., Sweeney E. (2005).** Nail patella syndrome revisited: 50 years after linkage. *Ann Hum Genet* **69**: 349-363
- Menke A.L., IJpenberg A., Fleming S., Ross A., Medine C.N., Patek C.E. (2003).** The *wt1*-heterozygous mouse; a model to study the development of glomerular sclerosis. *J Pathol* **200**: 667-674

- Merida I., Avila-Flores A., Merino E. (2008).** Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signaling. *Biochem J* **409**: 1-18
- Michaud J.-L., Lemieux L., Dube M., Vanderhyden B.C., Robertson S.J., Kennedy C.R.J. (2003).** Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant α -actinin-4. *J Am Soc Nephrol* **14**:1200-1211
- Michelsen J.W., Schmeichel K.L., Beckerle M.C., Winge D.R. (1993).** The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4404-4408
- Miner J.H. (1999).** Renal basement membrane components. *Kidney Int* **56**: 2016-2024
- Miner J.H., Sanes J.R. (1994).** Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: Sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J Cell Biol* **127**: 879-891
- Miner J.H., Morello R., Andrews K.L., Li C., Antignac C., Shaw A.S., Lee B. (2002).** Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation. *J Clin Invest* **109**: 1065-1072
- Miner J.H., Go G., Cunningham J., Patton B.L., Jarad G. (2006).** Transgenic isolation of skeletal muscle and kidney defects in laminin β 2 mutant mice: implications for Pierson syndrome. *Development* **133**: 967-975
- Moeller M.J., Soofi A., Braun G.S., Li X., Watzl C., Kriz W., Holzman L.B. (2004).** Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization. *EMBO J* **23**: 3769-3779
- Morello R., Zhou G., Dreyer S.D., Harvey S.J., Ninomiya Y., Thorner P.S., Miner J.H., Cole W., Winterpacht A., Zabel B., Oberg K.C., Lee B. (2001).** Regulation of glomerular basement membrane collagen expression by LMX1B contributes to renal disease in nail patella syndrome. *Nat Genet* **27**: 205-208

- Moriguchi T., Hamada M., Morito N., Terunuma T., Hasegawa K., Zhang C., Yokomizo T., Esaki R., Kuroda E., Yoh K., Kudo T., Nagata M., Greaves D.R., Engel J.D., Yamamoto M., Takahashi S. (2006).** MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol Cell Biol* **26**: 5715-5727
- Nakagawa T., Segal M., Croker B., Johnson R.J. (2007).** A breakthrough in diabetic nephropathy: the role of endothelial dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* **22**: 2775-2777
- Neumann T. (2008).** Identifizierung einer Funktion des Transkriptionsfaktors LMX1B bei der Regulation des Interferon-beta-Signalwegs. *Dissertation Universität Regensburg*
- Nielsen J.S., McNagny K.M. (2009).** The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol* **20**: 1669-1676
- Noakes P.G., Miner J.H., Gautam M., Cunningham J.M., Sanes J.R., Merlie J.P. (1995).** The renal Glomerulus of mice lacking α -laminin/laminin β 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin β 1. *Nat Genet* **10**: 400-406
- Oeckinghaus A., Hayden M.S., Ghosh S. (2011).** Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* **12**: 695-708
- Ohlson M., Sörensson J., Haraldsson B. (2001).** A gel-membrane model of glomerular charge and size selectivity in series. *Am J Physiol* **280**: F296-F405
- Otey C.A., Carpen O. (2004).** Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**: 104-111
- Ozaki K., Fujiwara T., Nakamura Y., Takahashi E. (1998).** Isolation and mapping of a novel human kidney- and liver-specific gene homologous to the bacterial acetyltransferases. *J Hum Genet* **43**: 255-258
- Palmer R.E., Kotsianti A., Cadman B., Boyd T., Gerald W., Haber D.A. (2001).** WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein podocalyxin. *Curr Biol* **11**: 1805-1809

Pelletier J., Bruening W., Kashtan C.E., Mauer S.M., Manivel J.C., Striegel J.E., Houghton D.C., Junien C., Habib R., Fouser L., Fine R.N., Silverman B.L., Haber D.A., Housman D. (1991). Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* **67**: 437-447

Pressman C.L., Chen H., Johnson R.L. (2000). LMX1B, a LIM homeodomain class transcription factor, is necessary for normal development of multiple tissues in the anterior segment of the murine eye. *Genesis* **26**: 15-25

Prestel J. (2003). Charakterisierung des LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktors 1 Beta (LMX1B) in induzierbaren Zelllinien. *Dissertation Universität Heidelberg*

Putaala H., Soininen R., Kilpeläinen P., Wartiovaara J., Tryggvason K. (2001). The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* **10**: 1-8

Quaggin S.E., Schwartz L., Cui S., Igarashi P., Deimling J., Post M., Rossant J. (1999). The basic-helix-loop-helix protein Pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development* **126**: 5771-5783

Raats C.J., van den Born J., Bakker M.A., Oppers-Walgreen B., Pisa B.J., Dijkman H.B., Assmann K.J., Berden J.H. (2000). Expression of agrin, dystroglycan and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* **156**: 1749-1765

Radice G.L., Ferreira-Cornwell M.C., Robinson S.D., Rayburn H., Chodosh L.A., Takeichi M., Hynes R.O. (1997). Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *J Cell Biol* **139**: 1025-1032

Ramjee G., Adhikari M., Cooyadia H.M. (1997). Depletion of glomerular anionic sites and proteinuria in nephrotic syndrome of children. *J Trop Pediatr* **43**: 149-152

Raschta A.-S. (2009). Molekulare Mechanismen der Regulierung der Expression von NF- κ B-Zielgenen durch den LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor 1 Beta. *Dissertation Universität Regensburg*

Raschle A., Neumann T., Raschta A.-S., Neumann A., Heining E., Kastner J., Witzgall R. (2009). The LIM-homeodomain transcription factor LMX1B regulates expression of NF-kappa B target genes. *Exp Cell Res* **315**: 76-96

Regele H.M., Fillipovic E., Langer B., Poczewski H., Kraxberger I., Bittner R.E., Kerjaschki D. (2000). Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* **11**: 403-412

Regoli M., Bendayan M. (1997). Alterations in the expression of the alpha 3 beta1 integrin in certain membrane domains of the glomerular epithelial cells (podocytes) in diabetes mellitus. *Diabetologia* **40**: 15-22

Reichold M. (2008). Die physiologische Rolle des 2-P-Domänen Kaliumkanals TWIK1 in der Niere und im Pankreas. *Dissertation Universität Regensburg*

Reiser J., Kriz W., Kretzler M., Mundel P. (2000). The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* **11**: 1-8

Ren Z., Liang W., Chen C., Yang H., Singhal P.C., Ding G. (2011). Angiotensin II induces nephrin dephosphorylation and podocyte injury: role of caveolin-1. *Cell Signal* **Epub ahead of print**

Renwick J.H., Lawler S.D. (1955). Genetic linkage between the ABO and nail-patella loci. *Ann Hum Genet* **19**: 312-331

Riddle R.D., Ensini M., Nelson C., Tsuchida T., Jessell T.M., Tabin C. (1995). Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* **83**: 631-640

Rodewald R., Karnovsky M.J. (1974). Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* **60**: 423-433

- Rohr C., Prestel J., Heidet L., Hosser H., Kriz W., Johnson R.L., Antignac C., Witzgall R. (2002).** The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a crucial role in podocytes. *J Clin Invest* **109**: 1073-1082
- Roselli S., Heidet L., Sich M., Henger A., Kretzler M., Gubler M.-C., Antignac C. (2004).** Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol* **24**: 550-560
- Ross M.J., Martinka S., D'Agati V.D., Bruggeman L.A. (2005).** NF-kappaB regulates Fas-mediated apoptosis in HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **16**: 2403-2411
- Ruotsalainen V., Ljungberg P., Wartiovaara J., Lenkkeri U., Kestilä M., Jalanko H., Holmberg C., Tryggvason K. (1999).** Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7962-7967
- Ryan G., Steele-Perkins V., Morris J.F., Rauscher F.J. 3rd, Dressler G.R. (1995).** Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* **121**: 867-875
- Ryu M., Mulay S.R., Miosge N., Gross O., Anders H.J. (2011).** Tumour necrosis factor- α drives Alport glomerulosclerosis in mice by promoting podocyte apoptosis. *J Pathol* **Epub ahead of print**
- Sachs N., Kreft M., van den Bergh Weerman M.A., Beynon A.J., Peters T.A., Weening J.J., Sonnenberg A. (2006).** Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *J Cell Biol* **175**: 33-39
- Schaffer M. (2011).** Charakterisierung induzierbarer, Podozytenspezifischer LMX1B Knockout Mäuse. *Dissertation Universität Regensburg*
- Schnabel E., Anderson J.M., Farquhar M.G. (1990).** The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* **111**: 1255-1263

Schoggins J.W., Wilson S.J., Panis M., Murphy M.Y., Jones C.T., Bieniasz P., Rice C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* **472**: 481-485

Schwab A., Hanley P., Fabian A., Stock C. (2008). Potassium channels keep mobile cells on the go. *Physiology* **23**: 212-220

Schwanzer-Pfeiffer D., Rossmanith E., Schildberger A., Falkenhagen D. (2010). Characterization of SVEP1, KIAA, and SRPX2 in an in vitro cell culture model of endotoxemia. *Cell Immunol* **263**: 65-70

Schwarz H., Blanco F.J., von Kempis J., Valbracht J., Lotz M (1996). ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood* **87**: 2839-2845

Schwarz K., Simons M., Reiser J., Saleem M.A., Faul C., Kriz W., Shaw A.S., Holzman L.B., Mundel P. (2001). Podocin, a raft associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* **108**: 1621-1629

Sellin L., Huber T.B., Gerke P., Quack I., Pavenstädt H., Walz G. (2003). NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J* **17**: 115-117

Seri M., Melchionda S., Dreyer S., Marini M., Carella M., Cusano R., Piemontese M.R., Caroli F., Silengo M., Zelante L., Romeo G., Ravazzolo R., Gasparini P., Lee B. (1999). Identification of LMX1B gene point mutations in italian patients affected with Nail-Patella syndrome. *Int J Mol Med* **4**: 285-290

Shawlot W., Behringer R.R. (1995). Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* **374**: 425-430

Shefer G., Benayahu D. (2010). SVEP1 is a novel marker of activated pre-determined skeletal muscle satellite cells. *Stem Cell Rev* **6**: 42-49

- Shih N.Y., Li J., Cotran R., Mundel P., Miner J.H., Shaw A.S. (2001).** CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* **159**: 2303-2308
- Shih N.Y., Li J., Karpitskij V., Nguyen A., Dustin M.L., Kanagawa O., Miner J.H., Shaw A.S. (1999).** Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* **286**: 312-315
- Smidt M.P., Asbreuk C.H.J., Cox J.J., Chen H., Johnson R.L., Burbach P.H. (2000).** A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nature Neurosci* **3**: 337-341
- Sobotta J., Welsch U. (2003).** Lehrbuch Histologie, *Urban & Fischer Verlag Elsevier GmbH, 1. Auflage*, München
- Srivastava T., Garola R.E., Whiting J.M., Alon U.S. (2001).** Synaptopodin expression in idiopathic nephritic syndrome of childhood. *Kidney Int* **59**: 118-125
- Starzyk R.M., Rosenow C., Frye J., Leismann M., Rodzinski E., Putney S., Tuomanen E.I. (2000).** Cerebral cell adhesion molecule: a novel leukocyte adhesion determinant on blood-brain barrier capillary endothelium. *J Infect Dis* **181**: 181-187
- Sugimoto H., Hamano Y., Charytan D., Cosgrove D., Kieran M., Sudhakar A., Kalluri R. (2003).** Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem* **278**: 12605-12608
- Sugimoto J., Wasaki M., Shiota K., Nomura Y. (1994).** Alterations in glomerular anionic sites in canine anti-glomerular basement membrane nephritis with onset of severe proteinuria. *Toxicol Pathol* **22**: 316-323
- Suleiman H. (2007).** The role of Lmx1b and Ldb1 in podocytes. *Dissertation Universität Regensburg*

- Suleiman H., Heudobler D., Raschta A.-S., Zhao Y., Zhao Q., Hertting I., Vitzthum H., Moeller M.J., Holzman L.B., Rachel R., Johnson R., Westphal H., Rascle A., Witzgall R. (2007).** The podocyte-specific inactivation of *Lmx1b*, *Ldb1* and *E2a* yields new insight into a transcriptional network in podocytes. *Dev Biol* **304**: 701-712
- Sutton T.A., Fisher C.J., Molitoris B.A. (2002).** Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int* **62**: 1539-1549
- Sweeney E., Fryer A., Mountford R., Green A., McIntosh I. (2003).** Nail patella syndrome: A review of the phenotype aided by developmental biology. *J Med Genet* **40**: 153-162
- Taira M., Evrard J.-L., Steinmetz A., Dawid I.B. (1995).** Classification of LIM proteins. *Trends Genet* **11**: 431-432
- Takemoto M., He L., Norlin J., Patrakka J., Xiao Z., Petrova T., Bondjers C., Asp J., Wallgard E., Sun Y., Samuelsson T., Mostad P., Lundin S., Miura N., Sado Y., Alitalo K., Quaggin S.E., Tryggvason K., Betsholtz C. (2006).** Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *EMBO J* **25**: 1160-1174
- Tamada K., Chen L. (2006).** Renewed interest in cancer immunotherapy with the tumor necrosis factor superfamily molecules. *Cancer Immunol Immunother* **55**: 355-362
- Tanoue T., Takeichi M. (2004).** Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cell-cell contact. *J Cell Biol* **24**: 517-528
- Tesch G.H. (2008).** MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**: F697-701
- Timpl R., Brown J.C. (1996).** Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays* **18**: 123-132
- Tong Y., Xu Y., Searce-Levie K., Ptacek L.J., Fu Y.H. (2010).** COL25A1 triggers and promotes Alzheimer's disease-like pathology in vivo. *Neurogenetics* **11**: 41-52

- Torii T., Miyamoto Y., Sanbe A., Nishimura K., Yamauchi J., Tanoue A. (2010).** Cytohesin-2/ARNO, through its interaction with focal adhesion adaptor protein Paxilin, regulates preadipocyte migration via the downstream activation of Arf6. *J Biol Chem* **285**: 24270-24281
- Torres M., Gomez-Pardo E., Dressler G.R., Gruss P. (1995).** Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* **121**: 4057-4065
- Tryggvason K., Patrakka J., Wartiovaara J. (2006).** Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* **354**: 1387-1401
- Tryggvason K., Patrakka J. (2006).** Thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **17**: 813-822
- Tryggvason K., Wartiovaara J. (2005).** How does the kidney filter plasma? *Physiology* **20**: 96-101
- Tryggvason K., Wartiovaara J. (2001).** Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**: 543-549
- Uchida K., Suzuki K., Iwamoto M., Kawachi H., Ohno M., Horita S., Nitta K. (2008).** Decreased tyrosine phosphorylation of nephrin in rat and human nephrosis. *Kidney Int* **73**: 926-932
- Uehara Y., Makino H., Seiki K., Urade Y. (2009).** Urinary excretions of lipocalin-type prostaglandin D synthase predict renal injury in type-2 diabetes: a cross-sectional and prospective multi-centre study. *Nephrol Dial Transplant* **24**: 475-482
- Vogel A., Rodriguez C., Warnken W., Izpisua Belmonte J.C. (1995).** Dorsal cell fate specified by chick Lmx1 during vertebrate limb development. *Nature* **378**: 716-720
- Vollrath D., Jaramillo-Babb V.L., Clough M.V., McIntosh I., Scott K.M., Lichter P.R., Richards J.E. (1998).** Loss-of-function mutations in the LIM-homeodomain gene, *LMX1B*, in nail-patella-syndrome. *Hum Mol Genet* **7**: 1091-1098

Wagner N., Wagner K.D., Xing Y., Scholz H., Schedl A. (2004). The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol* **15**: 3044-3051

Wartiovaara J., Öfverstedt L-G., Zhang J., Mäkelä E., Sandin S., Ruotsalainen V., Cheng R.H., Jalanko H., Skoglund U., Tryggvason K. (2004). Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* **114**: 1475-1483

Way J.C., Chalfie M (1988). *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* **54**: 5-16

Welsch U. (2003). Lehrbuch Histologie. *Urban und Fischer Verlag, München*

Wijnhoven T.J., Lensen J.F., Wismans R.G., Lefeber D.J., Rops A.L., van der Vlag J., Berden J.H., van den Heuvel L.P., van Kuppevelt T.H. (2007). Removal of heparan sulfate from the glomerular basement membrane blocks protein passage. *J Am Soc Nephrol* **18**: 3119-3127

Xu Z.G., Ryu D.R., Yoo T.H., Jung D.S., Kimm J.J., Kim H.J., Choi H.Y., Kim J.S., Adler S.G., Natarajan R., Han D.S., Kang S.W. (2005). P-Cadherin is decreased in diabetic Glomeruli and in glucose-stimulated podocytes in vivo and in vitro studies. *Nephrol Dial Transplant* **20**: 524-531

Yao J., Le T.C., Kos C.H., Henderson J.M., Allen P.G., Denker B.M., Pollak M.R. (2004). α -actinin-4-mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein. *PLoS Biol* **2**: 787-794

Yildirim-Toruner C., Subramanian K., El Manjra L., Chen E., Goldstein S., Vitale E. (2004). A novel frameshift mutation of FOXC2 gene in a family with hereditary lymphedema-distichiasis syndrome associated with renal disease and diabetes mellitus. *Am J Med Genet A* **131**: 281-286

Yonemura S., Itoh M., Nagafuchi A., Tsukita S. (1995). Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J Cell Sci* **108**: 127-142

Zenker M., Aigner T., Wendler O., Tralau T., Müntefering H., Fenski R., Pitz S., Schumacher V., Royer-Pokora B., Wühl E., Cochat P., Bouvier R., Kraus C., Mark K., Madlon H., Dötsch J., Rascher W., Maruniak-Chudek I., Lennert T., Neumann L.M., Reis A. (2004). Human laminin $\beta 2$ deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet* **13**: 2625-1632

Zhu J., Sun N., Aoudjit L., Li H., Kawachi H., Lemay S., Takano T. (2008). Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes. *Kidney Int* **73**: 556-566

7. Veröffentlichungen

Osten L., Kubitza M., Gallagher A.R., Kastner J., Olbrich H., de Vries U., Kees F., Lelongt B., Somlo S., Omran H., Witzgall R. (2009). Doxycycline accelerates renal cyst growth and fibrosis in the pcy/pcy mouse model of type 3 nephronophthisis, a form of recessive polycystic kidney disease. *Histochem Cell Biol* **132**: 199-210

Rasclé A., Neumann T., Raschta A.-S., Neumann A., Heining E., Kastner J., Witzgall R. (2009). The LIM-homeodomain transcription factor LMX1B regulates expression of NF-kappa B target genes. *Exp Cell Res* **315**: 76-96

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jürgen Kastner
geboren am: 29.08.1978
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1984 – 1988 Grundschule Wernberg-Köblitz
1988 – 1998 Gymnasium Nabburg: Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Wehrpflicht

1998 – 1999 Fallschirmjägerbataillon 261 in Lebach

Hochschulbildung

1999 – 2000 Studium der Rechtswissenschaften in Regensburg
2000 – 2004 Studium der Biologie in Regensburg: Abschluss Biologie Diplom
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie von Prof. Dr. R. Witzgall mit dem Thema „Charakterisierung des wachstumsinhibitorischen Effekts von LMX1B“

Promotion

seit 03/2005 Promotion am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie von Prof. Dr. R. Witzgall mit dem Thema „Die Rolle von Lmx1b bei der Aufrechterhaltung der podozytären Struktur“

Berufliche Tätigkeit

seit 09/2008 Tätigkeit als Lehrkraft an der Staatlichen Realschule Arnstorf

9. Danksagung

Ich möchte mich besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. R. Witzgall bedanken, der über die ganzen Jahre mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und auch zum Ende hin mit „durchgehalten“ hat, so dass diese Doktorarbeit doch noch zu ihrem Ende fand.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. R. Warth, der die Aufgabe des zweiten Gutachters übernommen hat, und bei Prof. Dr. R. Rachel für zahlreiche EM-Erläuterungen.

Mein Dank richtet sich selbstverständlich auch an PD. Dr. Anne Rascle, die immer für Gedankenreize, Motivation, Anleitung, Gespräche, Ideen und Planungen da war.

Und natürlich möchte ich allen Mit-Forschern danken, die den harten Laboralltag mit seinen Höhen und Tiefen mit mir teilen durften und ihn aber auch erträglich machten: Anne-Sarah, Astrid, Caro, Eva, Flash, Helen, Karin, Larissa, Lissy, Madeleine, Magdalena, Marion, Sonja und Tanja.

Ohne Uwe hätte gar nichts funktioniert, sei es an Mikroskopen oder mit der Technik. Dir einen besonderen Dank dafür.

Ich möchte auch nicht Ton, Antje und Anita vergessen, denen ich zahlreiche „Bearbeitungen“ zu verdanken habe.

Für die unkomplizierte Zusammenarbeit und immer nette Stimmung im Labor, am Gang, in der Küche oder „unten“ danke ich auch noch Prof. Dr. W. Minuth, PD. Dr. K. Szabo, Karin, Christine, Helga, Irmi, Hannelore, Sigi, Lucia, Franz und den Präparatoren.

An dieser Stelle möchte ich mich auch noch bei einer Person besonders bedanken, in welcher ich einen guten Freund und Weggefährten gefunden habe und mit dem sich eine tolle Freundschaft entwickelt hat: Till!

Der größte Dank gilt meiner Frau Irina, meinen Eltern und meinem Bruder. Ihr habt mich immer unterstützt, wart stets für mich da und geduldig (auch wenn's mal länger gedauert hat) und habt mir Rückhalt gegeben. Ich bin froh eine Familie wie euch zu haben. Danke nochmal dafür!